

**EINFLUSS VON DIURETIKA AUF DIE
GESAMTLIPIDE, DIE LIPIDE IN DEN
LIPOPROTEINFRAKTIONEN UND DIE
FREIEN FETTSÄUREN IM PLASMA GESUNDER
UND KRANKER MIT HYPERLIPOPROTEINÄMIE**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

**Erlangung der Doktorwürde
des**

**Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

**Despina Laaser geb. Kourniati
aus Chalkis, Griechenland**

~~1983~~

1984

**EINFLUSS VON DIURETIKA
AUF DIE GESAMTLIPIDE, DIE LIPIDE IN DEN
LIPOPROTEINFRAKTIONEN UND DIE FREIEN FETTSÄUREN
IM PLASMA GESUNDER UND KRANKER MIT HYPERLIPOPROTEINÄMIE**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereichs Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Despina Laaser geb. Kourniati

aus Chalkis, Griechenland

1983

1. Referent: Herr Prof. Dr. H. Kewitz
2. Referent: Herr Prof. Dr. A. Kreutzberger
3. Referent: Herr Prof. Dr. R. Hänsel

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 13. Juli 1984

Die vorliegende Arbeit wurde angefertigt unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. med. H. KEWITZ am
Institut für Klinische Pharmakologie der
Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz.

Die Aufgabenstellung und die Versuchspläne verdanke ich Herrn Prof. Dr. med. KEWITZ. Ihm möchte ich auch für die vielseitige Unterstützung herzlich danken.

Die ärztliche Untersuchung und Überwachung der Probanden und Patienten wie auch die Blutabnahmen wurden von Herrn Dr. med. Chr. JOOS und Herrn Dr. med. D. GAST durchgeführt. Mit Herrn Dr. med. Chr. JOOS arbeitete ich auch bei der Bestimmung der Triglyceride und des Cholesterins zusammen.

Dank schulde ich auch den Mitarbeitern des Instituts für ihre vielfältige Unterstützung sowie insbesondere der kürzlich verstorbenen Frau U. von GRODZICKI für ihre präzisen Laboranalysen und ihre stetige und freundliche Hilfsbereitschaft.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I EINLEITUNG	1
II MATERIAL UND METHODEN	4
1 Versuchsanordnung	4
1.1 Versuch A	4
1.2 Versuch B	5
1.3 Versuch C	6
1.4 Versuch D	6
1.5 Versuch E	7
2 Klinische Untersuchungen und Blutanalyse	8
3 Analytische Methoden	8
4 Gaschromatographische Bestimmung der freien Fettsäuren (nach GRÜNERT)	8
4.1 Derivatisierung der freien Fettsäuren	8
4.2 Abweichungen von der Fettsäure-Bestimmung nach GRÜNERT	9
4.3 Gaschromatographische Betriebsbedingungen	11
4.4 Auswertung der Gaschromatogramme	11
4.4.1 Trennstufenzahl	11
4.4.2 Auflösung des kritischen Paares	13
4.4.3 HETP- $\bar{u}$ -Kurve	14
4.5 Standardabweichung bei der Bestimmung der freien Fettsäuren	15
5 Fraktionierung der Plasma-Lipoproteine mittels Ultrazentrifugation (nach HATCH und LEES)	16
5.1 Geräte	18

	Seite
6 Bestimmung der Phospholipide	18
6.1 Bestimmung der Phospholipide mittels Dünnschichtchromatographie und Photometrie	18
6.1.1 Prinzip	18
6.1.2 Lösungsmittel und Reagenzien	18
6.1.3 Durchführung	19
6.1.3.1 Extraktion der Phospholipide aus dem Plasma	19
6.1.3.3 Phosphatbestimmung nach FUSKE und SUBBAROW	20
6.1.4 Quantitative Auswertung	21
6.1.5 Standardabweichung bei der Bestimmung der Phospholipide	21
6.2 Bestimmung der Phospholipide mit der Molybdat/Vanadat Reaktion	22
6.2.1 Prinzip	22
6.2.2 Reagenzien und Lösungsmittel	22
6.2.3 Durchführung	22
6.2.4 Quantitative Auswertung	23
6.2.5 Standardabweichung bei der Bestimmung der Phospholipide	23
7 Enzymatische Bestimmung der Triglyceride nach Verseifung (nach EGGSTEIN und KREUTZ)	24
7.1 Prinzip	24
7.2 Reagenzien und Lösungsmittel	25
7.3 Durchführung	25
7.4 Quantitative Auswertung	26
7.5 Standardabweichung bei der Triglycerid-Bestimmung	27
8 Enzymatische Bestimmung des Cholesterins (nach der CHOD-PAP Methode) (RÜSCHLAU, 1974)	28
8.1 Prinzip	28
8.2 Reagenzien und Lösungsmittel	29
8.3 Durchführung	29

		Seite
8.4	Quantitative Auswertung	30
8.5	Standardabweichung bei der Bestimmung des Cholesterins	30
9	Bestimmung anderer Parameter	31
10	Statistische Auswertung	31
	TABELLEN 1 - 17	35 - 48
	ABBILDUNGEN 1 - 9	49 - 59
III	ERGEBNISSE	60
1	Versuch A	60
1.1	Konzentrationsänderung der freien Fettsäuren im Plasma unter Diuretika-Behandlung	60
1.2	Veränderungen der Konzentrationen der Lipoproteine im Plasma unter Diuretika-Behandlung	61
1.3	Konzentrationsänderungen der Lipoproteinfraktionen im Plasma unter Behandlung mit Diuretika	62
1.4	Veränderungen anderer Parameter unter der Behandlung mit Diuretika	62
2	Versuch B	63
3	Versuch C	66
3.1	Veränderungen der Konzentrationen der freien Fettsäuren im Plasma unter Diuretika-Behandlung	66
3.2	Konzentrationsänderungen der Lipoproteine im Plasma unter Diuretika-Behandlung	67
3.3	Konzentrationsänderungen der Lipoproteinfraktionen unter Diuretika-Behandlung	67
3.4	Veränderungen anderer Parameter unter Behandlung mit Diuretika	68

		Seite
4	Versuch D	69
5	Versuch E	70
	TABELLEN 18 - 32	71 - 87
	ABBILDUNGEN 10 - 16	88 - 100
IV	DISKUSSION	101
	TABELLEN 33 - 34	110 - 111
	ABBILDUNG 17	112
	ZUSAMMENFASSUNG	113
	LITERATURVERZEICHNIS	115

I EINLEITUNG

Diuretika werden bei sehr vielen Patienten angewendet, denn zu ihren Indikationsgebieten gehören so häufige Krankheiten wie die Hypertonie und die Herzinsuffizienz. Meistens werden sie gut vertragen und rufen nur selten schwerwiegende unerwünschte Wirkungen hervor. In den letzten Jahren hat sich jedoch herausgestellt, daß die Thiazid-Diuretika zu einer Erhöhung der Plasmalipoproteine führen. Diesem Befund könnte eine größere Bedeutung zukommen, weil die Erhöhung bestimmter Fraktionen der Lipoproteine im Plasma die Entwicklung der Arteriosklerose begünstigt, daher als Risikofaktor für die coronare Herzerkrankung insbesondere des Herzinfarktes angesehen werden muß.

1964 stellten SCHOENFELD und GOLDBERG bei 4 von 6 Patienten einen Anstieg des Serum-Cholesterins von 19% nach einer 4-wöchigen Behandlung mit tgl 5 mg Bendroflumethiazid fest.

JOHNSON et al (1974) fanden bei 14 Hypertonikern nach einer 4-wöchigen Therapie mit tgl 50 mg Hydrochlorothiazid im Vergleich zu einer gleich langen Placebo-Periode um 28% höhere Triglycerid-Konzentrationen im Plasma. Bei 78 Hypertonikern, die 6 Monate Thiazide bekommen hatte, sahen sie einen - quantitativ nicht weiter angegebenen - Anstieg der Serum-Triglyceride und der elektrophoretisch getrennten prä- β -Lipoproteine.

AMES und HILL (1975 und 1976) berichteten über einen Anstieg von 24% für die Triglyceride und von 5% für das Cholesterin im Serum bei 39 Patienten mit leichter Hypertonie nach einer Diuretikabehandlung von 6 Monaten. Die verabfolgten Dosen waren sehr verschieden und betrugen 2mal wöchentlich 50 mg oder tgl. 100mg Chlorthalidon, 25 bis 50mg Hydrochlorothiazid pro Tag oder 25 bis 50mg Spironolakton täglich.

Bei 18 Hypertonikern fanden CHRYSANT et al jedoch keinen Anstieg der Plasma-Triglyceride und des Plasma-Cholesterins nach einer 9-monatigen Hydrochlorothiazid-Behandlung mit tgl 100mg.

1977 bestätigten SCHNAPPER et al die Aussage von AMES und HILL. Sie fanden, im Vergleich zu 325 nicht mit Diuretika Behandelten, bei 311 Hypertonikern, die ein Jahr mit 100 - 50mg Chlorthalidon täglich behandelt wurden, in einer kontrollierten Doppelblind-Studie eine 5%ige Erhöhung des Plasma-Cholesterins.

HELGELAND et al (1978) fanden keinen signifikanten Anstieg der Plasma-Triglyceride bei 150 Hypertonikern nach einer 3-jährigen Behandlung mit tgl 50mg Hydrochlorothiazid.

BAUMGARTNER et al (1978) berichteten über einen Anstieg der elektrophoretisch getrennten β -Lipoproteine in einer cross-over-Studie bei 11 Hypertonikern und 5 Gesunden, die mit 100mg Chlorthalidon, 80mg Furosemid und 50mg Mefrusid täglich jeweils über 4 Wochen behandelt wurden.

GRIMM et al (1978) stellten einen Anstieg der Triglyceride und des Cholesterins sowohl im Plasma als auch in der VLDL- und in der LDL-Fraktion bei 8 leicht hypertensiven Männern nach einer 6-wöchigen Therapie mit täglich 100mg Hydrochlorothiazid fest. HDL blieb unverändert.

1979 berichteten GLÜCK et al über einen Anstieg des LDL-Cholesterins und der β -Lipoproteine bei 18 Männern und Frauen mit essentieller Hypertonie nach einer 6-wöchigen Behandlung mit 100mg Chlorthalidon bzw. Hydrochlorothiazid pro Tag.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Plasmalipoproteine in very low density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL) und high density lipoprotein (HDL) fraktioniert und zusätzlich die freien Fettsäuren im Serum bestimmt, um die Art der Fettstoffwechselstörung näher zu charakterisieren. Nach Feststellung der Veränderungen in der VLDL, der LDL und der freien Fettsäuren bei gesunden Probanden wurde untersucht, ob die Wirkung mit steigender Dosis zunimmt, wie sie zeitlich abläuft in welcher Stärke sie bei Kranken auftritt, die bereits an einer Fettstoffwechselstörung leiden.

II MATERIAL UND METHODEN

1 Versuchsanordnung

1.1 Versuch_A

Der Versuch A diente zur Prüfung des Einflusses, den die Diuretika auf die Plasmalipoproteine und freien Fettsäuren gesunder Probanden ausüben.

Probanden:

An dem Versuch nahmen 12 klinisch gesunde männliche Studenten im Alter zwischen 20 und 32 Jahren teil. Ihr durchschnittliches Gewicht betrug $73,5 \pm 6,4$ kg und ihre mittlere Größe $178,8 \pm 4,6$ cm. Es war hier wichtig, ein einheitlich zusammengesetztes Kollektiv zu haben, um die ohnehin große Variation der Plasmalipoprotein-Spiegel so stark wie möglich einzuschränken. Daher wurden nur Männer etwa gleichen Alters ausgewählt, denn bei Frauen ändert sich der Plasmalipoprotein-Spiegel im Laufe des Menstruationszyklus und wird insbesondere durch orale Kontrazeptiva beeinflusst. Die Probanden waren Studenten, d.h. die körperlichen Tätigkeiten waren nicht sehr verschieden. Sie hatten keine stark voneinander abweichenden Eßgewohnheiten, rauchten nicht, tranken keinen Alkohol und nahmen keine weiteren Medikamente zu sich.

In Tabelle 1 sind die Daten der Probanden aufgeführt.

Medikamente:

Chlorthalidon und Hydrochlorothiazid wurden einmal täglich morgens nach dem Frühstück, Furosemid jeweils in eine Morgen- und eine Mittagsdosis aufgeteilt, oral eingenommen.

Tagesdosen:

Chlorthalidon (Hygroton mite ^(R))	2 Tabl. à 50mg
Hydrochlorothiazid (Esedrix ^R)	4 Tabl. à 25mg
Furosemid (Lasix ^(R))	2 Tabl. à 40mg

Versuchsablauf:

Es handelt sich um einen kontrollierten klinischen Versuch in der cross-over Anordnung mit randomisierter Reihenfolge der Behandlungsperioden. Die 12 Probanden wurden 4 Gruppen zugeteilt. Jedes der drei Diuretika und Placebo wurden 3 Wochen täglich eingenommen. Zwischen den 3-wöchigen Einnahmep perioden lag jeweils eine Woche ohne Medikamente, so daß die Versuchsdauer insgesamt 16 Wochen betrug (Abb. 1a). Alle Probanden haben den Versuch vollständig mitgemacht. Die Probanden wurden angewiesen, während des Versuchs ihre üblichen Lebens- und Essgewohnheiten beizubehalten und zum Ausgleich der Kalium-Verluste zusätzlich Obst und Gemüse zu essen. Die Einverständniserklärung der Probanden wurde nach umfassender Aufklärung über Wesen, Bedeutung

1.2 Versuch_B

und Tragweite des Versuchs eingeholt.

Der Versuch B diente zur Prüfung der Dosis-Wirkung-Beziehung.

Probanden:

An dem Versuch B nahmen 8 gesunde Männer teil. Ihr Alter lag zwischen 21 und 32 Jahren. Ihr mittleres Gewicht betrug $76,5 \pm 7,8$ kg und ihre durchschnittliche Größe $179,3 \pm 4,3$ cm. In Tabelle 2 sind die Daten der Probanden einzeln aufgeführt.

Medikamente:

Die Probanden nahmen jede der 3 Dosen, nämlich 50, 100 und 150mg Hydrochlorothiazid an 5 aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Frühstück ein.¹⁾

Versuchsablauf:

Die erste Blutentnahme erfolgt vor der Medikamenteneinnahme und gilt als Ausgangswert. In der anschließenden Versuchsphase wurde an jedem der nächsten Tage eine Dosis Blut entnommen. Daran schlossen sich noch 3 weitere Blutabnahmen in 2-tägigem Abstand an.

¹⁾ Bei der 100mg-Dosis mußten zwei Probanden wegen intercurrenter Erkrankung, die nicht im Zusammenhang mit der Medikation standen, den Versuch abbrechen.

1.3 Versuch C

Der Versuch C diente zur Prüfung der Diuretika-Wirkung auf die Plasmalipoproteine und freien Fettsäuren bei Patienten mit Hyperlipoproteinämie.

Patienten:

Es nahmen 6 Patienten mit Hyperlipoproteinämie teil, davon je 3 vom Typ IV und II_b. Ihr Alter lag zwischen 23 und 60 Jahren. Ihr durchschnittliches Gewicht betrug $82,2 \pm 11,3$ kg und ihre mittlere Größe $173,5 \pm 7,6$ cm. Sie waren Nichtraucher und nahmen während der Versuchszeit keinen Alkohol und keine weiteren Medikamente zu sich. In Tabelle 3 sind die Daten der Patienten einzeln aufgeführt. Die Patienten waren umfassend aufgeklärt worden und hatten ihre Zustimmung erklärt.

Medikamente:

Die Patienten nahmen täglich 100mg Hydrochlorothiazid ein.

Versuchsablauf:

Es handelt sich um einen klinischen Versuch in der cross-over Anordnung. Die 6 Patienten wurden 2 Gruppen zugeteilt. Hydrochlorothiazid und Placebo wurden 4 Wochen lang täglich eingenommen. Zwischen den beiden 4-wöchigen Behandlungsperioden lag eine Zeitspanne von 6 Wochen. Während jeder Periode wurde 7 mal Blut abgenommen, 3 Tage nach Beginn zum ersten Mal und danach 2 mal pro Woche.

1.4 Versuch D

Der Versuch D diente zur Prüfung der Dosis-Wirkung-Beziehung bei Kranken mit Hyperlipoproteinämie.

Patienten:

2 Patienten mit Hyperlipoproteinämie vom Typ IV im Alter von 36 und 48 Jahren erhielten 3 verschiedene Dosen von Hydrochlorothiazid. In Tabelle 4 sind die Daten der beiden Patienten aufgeführt.

Versuchsablauf:

An den drei vor der Medikamenteneinnahme liegenden Tagen wurde morgens nüchtern Blut abgenommen. Anschließend erhielten die Patienten an 11 Tagen täglich 50mg Hydrochlorothiazid. An den 15 darauffolgenden Tagen wurden keine Medikamente verabreicht. Nach dieser 15-tägigen Abklingsphase erhielten sie an 12 Tagen je 100mg Hydrochlorothiazid. An den darauffolgenden 18 Tagen wurde wiederum kein Medikament verabreicht. Einer der beiden Patienten erhielt während der nächsten 12 Tage erneut 150mg Hydrochlorothiazid täglich (Abb. 1b). Während aller Versuchsphasen erfolgte jeden zweiten Tag eine Blutabnahme.

1.5 Versuch_E

Der Versuch E diente zur Prüfung des Einflusses, den Zigarettenrauchen auf die Lipoproteine und freien Fettsäuren ausübt.

Probanden:

Bei 10 Rauchern (Tab. 5) - 4 davon mit Hyperlipoproteinämie, die auch am Versuch C teilgenommen hatten (E.R., S.E., W.A., P.O.) und 6 klinisch gesunden Männern - zwischen 23 und 51 Jahren wurde vor und nach dem Rauchen von 2 Zigaretten Blut entnommen. Die Patienten hatten nach umfassender Aufklärung ihre Einwilligung erklärt.

Versuchsablauf:

Der Versuch begann morgens eine Stunde nach dem Aufstehen und einer 12-stündigen Nahrungskarenz. Nach der Blutabnahme rauchten die Probanden 2 Zigaretten derselben Marke. 1/2 Stunde nach der zweiten Zigarette erfolgte die zweite Blutabnahme.

2 Klinische Untersuchungen und Blutanalysen

Tabelle 6 gibt die vorgenommenen klinischen Untersuchungen und Blutanalysen an. Das erforderliche Blutvolumen von 50ml wurde in jedem Versuch vormittags zur gleichen Uhrzeit, nach 12-stündiger Nahrungskarenz und 10-minütiger Ruhepause im Sitzen entnommen.

3 Analytische Methoden

Aufarbeitung des Blutes:

Das für die Lipid- und Lipoproteinbestimmung abgenommene Blut wurde durch Zusatz von Äthylendiaminotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat (E.D.T.A.) (1mg EDTA/ml Blut) ungerinnbar gemacht und durch 10 Minuten Zentrifugieren mit 3000 Umdrehungen pro Minute in Plasma und Zellen aufgetrennt.

Die Bestimmung der freien Fettsäuren erfolgte aus dem Serum. Serum für die Fettsäure-Bestimmung wurde gewonnen, indem natives Venenblut nach dem Gerinnen (1 Std., 4°C) mit 3000 Umdrehungen pro Minute 30 Minuten zentrifugiert wurde.

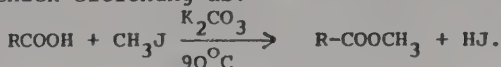
4 Gaschromatographische Bestimmung der freien Fettsäuren (nach GRÜNERT)

4.1 Derivatisierung der freien Fettsäuren

Die prozentuale Zusammensetzung der freien Fettsäuren im Plasma ändert sich mit der Gesamtkonzentration. Im Nüchternzustand entspricht die prozentuale Zusammensetzung der freien Fettsäuren im Plasma derjenigen im Fettgewebe. Palmitin-(C₁₆), Stearin-(C₁₈), Öl-(C_{18:1}) und Linolsäure (C_{18:2}) stellen dann ca. 70% der gesamten Fettsäuren im Plasma (ROTHLIN) und ca. 80% der in den Plasmatriglyceriden vorkommenden Fettsäuren dar (GNAUCK).

Die freien Fettsäuren müssen für die gaschromatographische Trennung und Bestimmung in leicht flüchtigen Fettsäure-Alkylester umgewandelt werden. Unveresterte Fettsäuren erfordern eine um 20^o - 40^oC höhere Temperatur, bei der die Zersetzungsgefahr zu groß ist. Die Hauptschwierigkeit liegt in der quantitativen Veresterung, besonders bei den ungesättigten Fettsäuren. Hierbei kommt es leicht zu Isomerisierungs-, Umesterungs-, Sättigungs- und Nebenreaktionen.

GRÜNERT (1975) führte die Veresterung mit Methyljodid nach CLAISEN (1894) in die gaschromatographische Analyse der freien Fettsäuren ein. Die Reaktion läuft nach der folgenden Gleichung ab:



Umesterungs-, Isomerisierungs-, Sättigungs- oder andere Nebenreaktionen sollen dabei nicht auftreten. Die eigene Erfahrung hat gezeigt, daß auch nach zweistündiger Methylierung bei 90^oC keine Veränderungen der Fettsäuren eintrat.

4.2 Abweichungen von der Fettsäure-Bestimmung nach GRÜNERT

Die Extraktion der freien Fettsäuren aus dem Serum erfolgte durch Zusatz von 2,8ml der Extraktionslösung, die aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1 bestand. Der Extraktionslösung wurde Margarinsäure (C₁₇) in einer Konzentration von 0,5mmol/l zugefügt. Margarinsäure diente als innerer Standard für die quantitative Auswertung der freien Fettsäuren. Durch 10 Minuten Zentrifugieren mit 5000 Umdrehungen pro Minute bei 5^oC wurde das Serum in eine wäßrige Eiweißschicht und in eine organische Phase, welche die hydrophoben Fettsäuren enthält, aufgetrennt. Aus dem organischen Extrakt wurde ein aliquoter Teil von 2ml abgehoben. Mit einem Rotationsverdampfer wurde das organische Lösungsmittel im Vakuum bei Zimmertemperatur entfernt.

Nach GRÜNERT's Methode wird zum Rückstand, welcher die extrahierten Fettsäuren enthält, ein Überschuß des Methylierungsgemisches aus Essigsäureäthylester/Methyljodid (1:1) gegeben. Anschließend werden die Fettsäuren 1 Stunde bei 90°C verestert und das gesamte Gemisch - bestehend aus Fettsäuremethylestern und überschüssigem Methylierungsgemisch - wird in einem Volumen von 1 - 2 μ l auf die Trennsäule gegeben.

Dieses Vorgehen hat sich in eigenen Voruntersuchungen nicht bewährt, weil bei Verwendung von bereits gebrauchten Trennsäulen nach Aufbringen von reinem Methyljodid oder im Gemisch mit Essigsäureäthylester Peaks mit den gleichen Retentionszeiten auftreten, wie die Peaks der Fettsäuremethylester.

Aus der Tatsache, daß nach Einspritzen von Methyljodid-Lösung in eine gebrauchte Trennsäule ein Fettsäuremethylester-Chromatogramm erhalten wird, kann geschlossen werden, daß Methyljodid die unveresterten Fettsäuren, welche in der stationären Phase zurückgehalten wurden, bei den hohen Betriebstemperaturen zu Fettsäuremethylester methyliert.

Daher wurde die GRÜNERT-Methode abgewandelt für die eigenen Fettsäure-Analysen erprobt und angewendet. Nach der Methylierung wurde das überschüssige Essigsäureäthylester/Methyljodid-Gemisch abgedampft, der Rückstand in 100 μ l Essigsäuremethylester aufgenommen und auf die Trennsäule gegeben.

Bei eigenen Voruntersuchungen wurde Palmitinsäuremethylester in verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 307 bis 31 μ mol/l auf eine Säule gegeben und die Peakfläche gemessen (Abb. 2). Als Lösungsmittel wurde entweder Essigsäureäthylester (Kurve a.) oder Essigsäureäthylester/Methyljodid im Verhältnis 1:1 (Kurve b.) verwendet. Die Abbildung 2 zeigt deutlich den Einfluß des Methyljodids auf die Peakfläche in Form einer für alle Konzentrationen gleich großen Zunahme.

4.3 Gaschromatographische Betriebsbedingungen

Die gaschromatographische Analyse erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Gerät: Hewlett Packard, 5710 A mit Integrator 3385 A

Säule: Glassäule 120 cm lang, 4 mm innerer Durchmesser

Säulenpackung:

Trägermaterial Chromosorb mit einer Körnung von 80 - 100 mesh, belegt mit 10% Diäthylen-Glycol-Succinat (DEGS).

Trägergas: Stickstoff (40 - 45ml/min)

Verbrennungsgemisch:

Wasserstoff (30 ml/min) und Sauerstoff (180ml/min)

Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID)

Betriebstemperatur:

Injektor 200°C, Detektor 250°C, Ofen 170°C (isotherm)

Im Versuch A betrug die Ofentemperatur 190°C.

4.4 Auswertung der Gaschromatogramme

Für die Beurteilung der Qualität der Fettsäure-Chromatogramme wurden folgende Parameter bestimmt: Trennstufenzahl, Auflösung des kritischen Paares und HETP- $\bar{u}$ -Kurve.

4.4.1 Trennstufenzahl

KAISER (1965) beurteilt die Trennstufenzahl einer Säule wie folgt:

Bei einer Trennstufenzahl von

500 pro Meter Säulenlänge	→	mässige bis schlechte Trennkraft der Säule
um 1000 " " " "	→	gute Trennkraft der Säule
2000 " " " "	→	sehr gute Trennkraft der Säule.

Die Trennstufenzahl der verwendeten Säule wurde nach folgender Formel berechnet:

$$n = 5,54 \left(\frac{t}{b_{0,5}} \right)^2$$

wobei n = theoretische Trennstufenzahl

$b_{0,5}$ = Breite des Peaks in halber Höhe (in cm)

t = Retentionszeit des Peaks (in cm).

Für das Chromatogramm der Abbildung 3 ergeben sich folgende Trennstufenzahlwerte:

$$C_{16} : b_{0,5} = 0,2 \text{ cm}$$

$$t = 3,68 \text{ cm}$$

$$n = \underline{1876}$$

$$C_{17} : b_{0,5} = 0,25 \text{ cm}$$

$$t = 5,60 \text{ cm}$$

$$n = \underline{2780}$$

$$C_{18} : b_{0,5} = 0,30 \text{ cm}$$

$$t = 7,20 \text{ cm}$$

$$n = \underline{3191}$$

$$C_{18:1} : b_{0,5} = 0,40 \text{ cm}$$

$$t = 8,00 \text{ cm}$$

$$n = \underline{2216}$$

$$C_{18:2} : b_{0,5} = 0,50 \text{ cm}$$

$$t = 10,00 \text{ cm}$$

$$n = \underline{2216}$$

Die Trennstufenzahl pro Meter Säulenlänge betrug also für:

$$C_{16} : 1563$$

$$C_{18:1} : 1847$$

$$C_{17} : 2317$$

$$C_{18:2} : 1847$$

$$C_{18} : 2659$$

Für alle fünf Fettsäuren, die bestimmt wurden, liegt die Trennstufenzahl im Bereich von 1563 bis 2659. Im Vergleich zu KAISER's (1965) Bewertungsskala über die Trennkraft einer Säule war die Trennkraft der Säule bei den eigenen Analysen gut bis sehr gut.

4.4.2 Auflösung des kritischen Paares

Die Auflösung (θ) eines Komponentenpaares gibt das Maß der Peaküberlagerung der beiden Komponenten an. Wenn die Betriebsbedingungen für die Trennung des kritischen Paares ausreichen, ist die der weiteren Komponenten gesichert.

Bei einem θ von:

50% überlagert sich das Paar um 12,5%

80% " " " " " " 3,2%

90% " " " " " " 0,9%

99% " " " " " " 0,0001%

(nach KAISER 1965)

Die Auflösung θ eines Paares wird wie folgt berechnet:

$$\theta = \frac{f}{g}$$

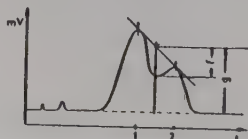


Abb. 4: Zur Auflösung eines kritischen Paares bei der gaschromatographischen Analyse

Bei der eigenen gaschromatographischen Analyse stellt Stearinmethylester/Ölsäuremethylester das kritische Paar dar. Ihre Retentionsdifferenz beträgt 0,8 cm.

Anhand der Chromatogrammbildung 3 wurde die Auflösung des kritischen Paares berechnet ($C_{18} / C_{18:1}$):

$$f = 7,3 \text{ cm}$$

$$g = 7,8 \text{ cm}$$

$$\bar{O} = \frac{f}{g} = 0,94$$

Die Auflösung des $C_{18}/C_{18;1}$ -Paares beträgt 94%. Folglich ist die Überlagerung des kritischen Paares kleiner als 0,9% (nach KAISER 1965).

4.4.3 HETP- $\bar{u}$ -Kurve

Die Bodenhöhe h (HETP) steht im folgenden Verhältnis zu der Trennstufenzahl:

$$1. \quad h = \frac{L}{n} \quad \begin{array}{l} L = \text{Länge der Säule} \\ n = \text{Trennstufenzahl} \end{array}$$

Der Zusammenhang zwischen der Trennstufenzahl und der Retentionszeit wird durch folgende Formel beschrieben:

$$2. \quad n = 5,54 \left(\frac{t}{b_{0,5}} \right)^2 \quad \begin{array}{l} n = \text{Trennstufenzahl} \\ t = \text{Retentionszeit} \\ b_{0,5} = \text{Breite des Peaks in} \\ \quad \text{halber Höhe} \end{array}$$

Aus den Gleichungen 1. und 2. geht hervor, daß die Trennstufenzahl bzw. die Bodenhöhe durch Veränderung der Retentionszeit beeinflußt werden kann. Die Retentionszeit ist abhängig von der Trägergasgeschwindigkeit.

Die minimale Bodenhöhe, d.h. die maximale Trennstufenzahl bzw. Trennkraft der Säule wäre theoretisch bei einer bestimmten geringeren Trägergasgeschwindigkeit zu erreichen. Bei den Betriebsbedingungen einer gaschromatographischen Analyse liegt sie aber immer über dem theoretischen Minimum.

Aus der Darstellung der HETP- $\bar{u}$ -Kurve (Abb. 5) kann die Trägergasgeschwindigkeit ermittelt werden, bei welcher die Bodenhöhe einen akzeptablen Wert erreicht hat. Bei den eigenen Voruntersuchungen wurde die Trägergasgeschwindigkeit im Bereich von 20 bis 70 ml/min variiert und die

entsprechende Bodenhöhe anhand des C_{16} -Peaks nach der Formel 1. errechnet. Aus den ermittelten Werten wurde die HETP- $\bar{u}$ -Kurve gezeichnet (Abb. 5).

Aus der HETP- $\bar{u}$ -Kurve geht hervor, daß für die eigene Analyse die beste Trägergasgeschwindigkeit im Bereich von 30 bis 50 ml/min liegt. In diesem Bereich bleibt die Bodenhöhe nahezu stabil. Ab einer Trägergasgeschwindigkeit über 50 ml/min steigt die Bodenhöhe steil an.

4.5 Standardabweichung bei der Bestimmung der freien Fettsäuren

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für die freien Fettsäuren wurde durch eine mehrfache Bestimmung ermittelt. Aus einem menschlichen Serum wurden 12 Proben von jeweils 200 μ l entnommen und die freien Fettsäuren bestimmt, so daß der ganze Analysenvorgang 12 mal durchgeführt wurde. Die einzelnen Werte der 12-fachen Bestimmung sind in der Tabelle 7 aufgeführt. Bei einer mittleren Konzentration der Palmitinsäure von 215 μ mol/l, der Stearinsäure von 80 μ mol/l, der Ölsäure von 209 μ mol/l und der Linolsäure von 119 μ mol/l betrug die Standardabweichung $\pm 11,9$ μ mol/l, $\pm 9,6$ μ mol/l, $\pm 8,8$ μ mol/l und $\pm 7,6$ μ mol/l (Tabelle 7).

Die Wiederfindungsrate wurde für unveresterte Fettsäuren und für Fettsäuremethylester ermittelt. Es wurden Fettsäuren- bzw. Fettsäuremethylester-Lösungen bekannter Konzentrationen hergestellt. Das Lösungsmittel - eine Mischung aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1 - enthielt Margarin- bzw. Margarinsäuremethylester von bekannter Konzentration. Margarinsäuremethylester diente als Standard für die gaschromatographische Auswertung. Der gewählte Konzentrationsbereich war für die unveresterten und veresterten Fettsäuren identisch. Er lag für die Palmitinsäure zwischen 250 und 150 μ mol/l, für die Stearinsäure zwischen 100 und 50 μ mol/l, für die Ölsäure zwischen 175 und 125 μ mol/l und für die Linolsäure zwischen 125 und 75 μ mol/l.

Aus jeder Fettsäure-Lösung wurde eine Probe von 200 μ l entnommen und die Fettsäuren nach der oben angegebenen Methode methyliert und gaschromatographisch bestimmt. Die gemessene und authentische Konzentration für die einzelnen Fettsäuren sind in der Tabelle 8 aufgeführt. Bei einer mittleren Wiederfindungsrate für Palmitinsäure von 85%, für Stearinsäure von 77%, für Ölsäure von 77% und für Linolsäure von 73% betrug die Standardabweichung $\pm 0,8\%$, $\pm 3,1\%$, $\pm 1\%$ und $\pm 2,7\%$ (Tab. 8).

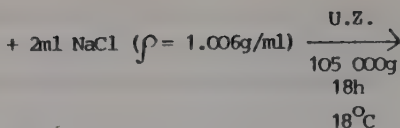
Für jede Fettsäuremethylester-Lösung wurde die Konzentration des Methylesters gaschromatographisch gemessen. Tabelle 9 gibt die gemessenen und authentischen Konzentrationen wieder. Die mittlere Wiederfindungsrate und die Standardabweichung betrug für den Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäuremethylester 94% $\pm 0,4\%$, 98% $\pm 5,5\%$, 100% $\pm 1,0\%$ und 99% $\pm 2,0\%$ (Tab. 9).

Aus den Werten der gemessenen und authentischen Konzentrationen (Tab. 8 und 9) wurden für die unveresterten und veresterten Fettsäuren jeweils Eichkurven gezeichnet (Abb. 6 I., II.). Die Eichkurven waren für alle 4 Fettsäuren im gewählten Konzentrationsbereich linear.

5 Fraktionierung der Plasma-Lipoproteine mittels Ultrazentrifugation (nach HATCH und LEES)

Die Fraktionierung der Lipoproteine des Plasmas erfolgte mit der Ultrazentrifuge. Dazu wurde Nüchtern-Plasma verwendet, in dem keine Chylomikronen vorkommen.

Das unterschiedliche Protein-Lipid-Verhältnis der Lipoproteinmoleküle ist verantwortlich für ihre unterschiedliche Dichte. Das durch Zugabe von Salzlösungen verschiedener Dichte suspendierte Plasma wird ultrazentrifugiert und die Lipoproteine trennen sich nach ihrer Dichte. Folgendes Schema stellt das methodische Vorgehen bei der Ultrazentrifugation der Lipoproteine nach HATCH und LEES dar:



$< 1.006\text{g/ml} \rightarrow \text{VLDL } (2 \times 1\text{ml})$

$> 1.006\text{g/ml } (\text{LDL} + \text{HDL}) + 2\text{ml NaBr } (\rho = 1.1816\text{g/ml}) \xrightarrow[18\text{h}]{\text{U.Z.}, 105\,000\text{g}} 18^\circ\text{C}$



$< 1.1816\text{g/ml} \rightarrow \text{LDL } (2 \times 1\text{ml})$

$> 1.1816\text{g/ml } (\text{HDL}) + 2\text{ml NaBr } (\rho = 1.4744\text{g/ml}) \xrightarrow[24\text{h}]{\text{U.Z.}, 105\,000\text{g}} 18^\circ\text{C}$



$< 1.4744\text{g/ml} \rightarrow \text{HDL } (2 \times 1\text{ml})$

$> 1.4744 \text{ (Albumin - Freie Fettsäuren und andere Plasmaproteine)}$

Die VLDL-Fraktion wird durch Zugabe einer Kochsalzlösung der Dichte von $1,006\text{ gcm}^{-3}$ zum Plasma und nach 18-stündiger Ultrazentrifugation bei 18°C gewonnen. Die Very Low Density Lipoproteine (VLDL) (Dichte $\rho < 1,006\text{ gcm}^{-3}$) flotierte, bildet eine Grenzschicht zu der Salzlösung und wird von den schweren Molekülen der Low Density Lipoproteine (LDL) und der High Density Lipoproteine (HDL), die sedimentieren, abgetrennt.

Nacheinander werden in derselben Weise die übrigen Lipoproteine getrennt, die LDL-Fraktion durch Zugabe einer NaBr-Lösung der Dichte $\rho = 1,1816\text{ gcm}^{-3}$ und nach 18-stündiger Ultrazentrifugation bei 18°C , die HDL-Fraktion durch Zugabe einer NaBr-Lösung der Dichte $\rho = 1,4744\text{ gcm}^{-3}$ und nach 24-stündiger Ultrazentrifugation bei 18°C . Die Salzlösungen verschiedener Dichte wurden nach LINDGREN et al (1972) hergestellt. Ihre Dichte wurde durch ein Refraktometer überprüft. Die Ultrazentrifugation erfolgte für alle Lipoprotein-Fractionen mit einer Geschwindigkeit von 105.000g .

5.1 Geräte

Die Ultrazentrifugation wurde bei 42.000 Umdrehungen pro Minute und einer Temperatur von 18°C im Vakuum durchgeführt mit einer

- Ultrazentrifuge der Firma BECKMANN, Modell L2-65B,
- Festwinkelroter der Firma BECKMANN des Typs 50 T1,
- Polycarbonatröhrchen der Firma BECKMANN, dickwandig mit einem Volumen von 10ml.

6 Bestimmung der Phospholipide

6.1 Bestimmung der Phospholipide mittels Dünnschichtchromatographie und Photometrie

6.1.1 Prinzip:

1. Schritt: Trennung der lipophilen Phospholipide von den hydrophilen phosphathaltigen Bestandteilen des Plasmas.
2. Schritt: Auftrennung und Isolierung der Phospholipide durch Dünnschichtchromatographie in Phosphatidylcholin, Sphingomyelin, Lysophosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin.
3. Schritt: Quantitative photometrische Bestimmung des in den isolierten Phospholipiden enthaltenen Phosphats.

6.1.2 Lösungsmittel und Reagenzien:

Chloroform: Methanol 2:1 (p.a.)

0,05m Kaliumchlorid

Chloroform : Aceton : Methanol : 96% Essigsäure : Wasser (p.a.)

50 : 20 : 10 : 10 : 5

70% Perchlorsäure (p.a.)

0,22% Ammoniumheptamolybdatlösung

Fiske-Subbarow- Reagenz:

- Natriumdisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) von der Firma MERCK (p.a.)
 - Ammoniumnaphtolsulfonsäure ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_4\text{S}$) von der Firma MERCK (zur Phosphatbestimmung)
 - Natriumsulfit (Na_2SO_3) von der Firma MERCK (p.a.)
- 7g Natriumdisulfit und 0,125g Ammoniumnaphtolsulfonsäure werden in 50ml bidestilliertem Wasser gelöst. Dazu wird eine 30%ige Natriumsulfitlösung gegeben.

Phosphat-Standard:

- Dinatrium-Phenylphosphat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_2\text{O}_4\text{Px}2\text{H}_2\text{O}$) von der Firma MERCK (p.a.)
- 32,8mg Dinatrium-Phenylphosphat in 1 Liter bidestilliertem Wasser.

Kieselgel in Form von Kieselgelplatten von der Firma MERCK (Schichtdicke 0,25mm).

6.1.3 Durchführung

6.1.3.1 Extraktion der Phospholipide aus dem Plasma

Als Extraktionsmittel dient ein Gemisch aus Chloroform/Methanol im Verhältnis 2:1 (NELSON, 1972). 0,5ml EDTA-Plasma werden mit 20ml der Extraktionslösung versetzt und 10 Minuten geschüttelt. Zur besseren Extraktion der Phospholipide werden 5ml 0,05m Kaliumchlorid dazugegeben (GILLET, 1975). Nach weiteren 10 Minuten Schütteln und 5-minütigem Zentrifugieren werden aus der organischen Phase, die die Phospholipide enthält, 5ml entnommen und im Wasserbad unter N_2 bei 37°C zur Trockne eingengt.

6.1.3.2 Dünnschichtchromatographie

Der Rückstand des Chloroform/Methanol-Extraktes aus dem Plasma wird mit Chloroform aufgenommen und mit Hilfe einer Glaskapillare zur Dünnschichtchromatographie strichförmig auf Kieselgelplatten aufgetragen. Zur Auftrennung der Phospho-

lipide wird als Laufmittel eine Lösung aus Chloroform : Aceton : Methanol : Essigsäure : Wasser im Verhältnis 50:20:10:10:5 verwendet.

Zur Anfärbung der Amine und Ammoniumverbindungen werden die Kieselgelplatten in eine Glaskammer mit Joddämpfen gestellt. Die Joddämpfe entstehen aus elementarem Jod, das am Boden der Glaskammer verteilt ist. Die Cholin- und Äthanolaminhaltigen Verbindungen färben sich braun an, so daß auf den Platten Banden entstehen, die ausgekratzt und in Gläser gegeben werden, die vorher sorgfältig mit Chromschwefelsäure gereinigt wurden und phosphatfrei waren. Die Identifizierung der einzelnen Phospholipide erfolgte durch den Vergleich ihre Rf-Werte mit denjenigen der Referenzsubstanzen.

In Tabelle 10 sind die Bedingungen der dünnschichtchromatographischen Trennung der Phospholipide zusammengestellt. Um ein geeignetes Laufmittel zu finden, wurden zahlreiche Versuche durchgeführt. In Tabelle 11 sind die RF-Werte in zwei geeigneten Laufmitteln aufgeführt.

6.1.3.3 Phosphatbestimmung nach FUSKE und SUBBAROW

Die bandförmig ausgekratzen Kieselgelportionen werden mit 0,7ml 70%iger Perchlorsäure versetzt und durch Erhitzen auf 180°C im Aluminiumblock für 30 Minuten vollständig verascht. Nach Abkühlen der Gläser versetzt man dies mit 4,6ml 0,22%iger Ammoniummolybdatlösung und 0,2ml Fiske-Subbarow Reagenz und erhält den Komplex, der aus ortho-Phosphat mit Ammoniummolybdat gebildet wird und der dann mit dem Fiske-Subbarow Reagenz in Molybdänblau (blaue Fällung) umgewandelt wird. Danach wird noch einmal für 10 Minuten auf 100°C erhitzt, gemischt und schließlich bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Extinktion des Molybdänblauphosphat-Komplexes bei 830nm wird gegen den Leerwert mit Hilfe eines Absorptions-Spektralphotometers (Fa. Zeiss, Modell DM Q II) gemessen. Zur Kontrolle werden in jedem Versuch zwei Standardproben mit bekannten Phosphatkonzentrationen mitgeführt.

Aus der Eichkurve (Abb. 7) ist zu ersehen, daß bei einer Extinktion größer als 400 das Lambert-Beer'sche Gesetz nicht mehr zutrifft, so daß höher konzentrierte Lösungen verdünnt werden müssen. Bei der quantitativen Auswertung wird der errechnete Wert mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

6.1.4 Quantitative Auswertung

Die Konzentration der Phospholipide wurde nach folgender Formel berechnet:

$$C_P = \frac{E_P}{E_{Std}} \times \frac{16}{31} \quad (\text{nmol/l})$$

C_P = Konzentration der Phospholipide

E_P = Extinktion der Probe

E_{Std} = Extinktion des Standards

6.1.5 Standardabweichung bei der Bestimmung der Phospholipide

Die Reproduzierbarkeit der Werte wurde durch 6 Bestimmungen der Phospholipide im selben Plasma festgestellt. Die mittlere Konzentration für Phosphatidylcholin betrug 1373, $\mu\text{mol/l}$ und die Standardabweichung $\pm 134,59$, $\mu\text{mol/l}$, für Sphingomyelin 481 $\pm 23,66$, $\mu\text{mol/l}$, für Lysophosphatidylcholin 203 $\pm 19,86$, $\mu\text{mol/l}$ und für Phosphatidyläthanolamin 77,3 $\pm 10,93$, $\mu\text{mol/l}$ (Tab. 12).

Die Wiederfindungsrate wurde wie folgt ermittelt:

Es wurden jeweils 4 Lösungen von Phosphatidylcholin, Sphingomyelin, Lysophosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin mit bekannten Konzentrationen hergestellt. Der Konzentrationsbereich für Phosphatidylcholin lag zwischen 218 und 1635, $\mu\text{mol/l}$, für Sphingomyelin zwischen 222 und 1664, $\mu\text{mol/l}$, für Lysophosphatidylcholin zwischen 48 und 193, $\mu\text{mol/l}$ und für Phosphatidyläthanolamin zwischen 60 und 150, $\mu\text{mol/l}$ (Tab. 13).

Die Phospholipide wurden mittels Dünnschichtchromatographie und Photometrie bestimmt und aus den authentischen und gemessenen Konzentrationen wurde die Wiederfindungsrate berechnet. Die mittlere Wiederfindungsrate betrug für Phosphatidylcholin 91% ($\pm 8,1\%$), für Sphingomyelin 87% ($\pm 5,5\%$), für Lysophosphatidylcholin 83% ($\pm 8,8\%$) und für Phosphatidyläthanolamin 84% ($\pm 10,2$). Abbildung 8 stellt die Eichkurven der Phospholipide im gewählten Konzentrationsbereich dar. Es sind die authentischen gegen die gemessenen Konzentrationen aufgetragen.

6.2 Bestimmung der Phospholipide mit der Molybdat/Vanadat-Reaktion

6.2.1 Prinzip

Die Phospholipide werden direkt im Plasma bestimmt und nicht extrahiert und aufgetrennt. Mit Perchlorsäure/Wasserstoffperoxid erfolgt die Oxydation zum Phosphat, das mit Molybdat und Vanadat einen Farbkomplex bildet, dessen Extinktion photometrisch gemessen wird.

6.2.2 Reagenzien und Lösungsmittel

Die Bestimmung erfolgte mit den Reagenzien der Phospholipid-Test-Packung der Firma Boehringer Mannheim (Best.Nr. 124974).

- Lösung 1: Ammoniumvanadat	21 mmol/l
Salpetersäure	0,28 N
- Lösung 2: Ammoniummolybdat	40 mmol/l
Schwefelsäure	2,5 N
- Lösung 4: Phosphat (Standard)	1,61 mmol/l

Perchlorsäure 70% (p.a.)

Wasserstoffperoxid 30% (p.a.)

6.2.3 Durchführung

Die Bestimmung wurde nach der Vorschrift der Test-Packung durchgeführt.

Zu 0,1ml EDTA-Plasma werden 0,5ml 70% Perchlorsäure und 0,2ml 30% Wasserstoffperoxid gegeben und für 15 Minuten im Heizblock auf 180 - 200°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur werden 2ml destilliertes Wasser, 1ml Lösung 1 und 1ml Lösung 2 dazugegeben und gemischt. Phosphat bildet mit Molybdat und Vanadat einen Farbkomplex mit einem Extinktionsmaximum bei 405nm. Die Extinktionsmessung erfolgte mit dem Eppendorf-Photometer. Zur Kontrolle wurde in jedem Versuch eine Probe von 0,1ml aus der Lösung 4 (Standard-Lösung) mitgeführt.

6.2.4 Quantitative Auswertung

Die Konzentration der Phospholipide wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$C_P = \frac{E_P}{E_{Std}} \times 1,6 \quad (\text{mmol/l})$$

C_P = Konzentration der Phospholipide

E_P = Extinktion der Probe

E_{Std} = Extinktion des Standards.

In der Test-Packung ist vorgeschrieben, daß bei einem höheren Phosphatgehalt als 16,1 mmol/l das Lambert-Beer'sche Gesetz nicht mehr zutrifft. 0,2ml EDTA-Plasma werden dann mit 0,8ml Natriumchlorid-Lösung 0,9% (Fa. Boehringer Mannheim, Best-Nr. 125326) verdünnt. Davon werden 0,1ml zur Bestimmung entnommen. Das Ergebnis muß mit 5 multipliziert werden.

6.2.5 Standardabweichung bei der Bestimmung der Phospholipide

Tabelle 14 zeigt die Werte von 12 Bestimmungen der Phospholipide im selben Plasma. Bei einer mittleren Konzentration von 6112, $\mu\text{mol/l}$ betrug die Standardabweichung $\pm 120,74$, $\mu\text{mol/l}$

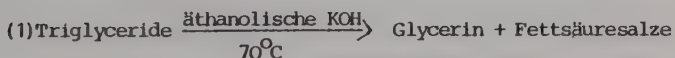
Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurden 5 Phospholipid-Lösungen mit bekannten Konzentrationen hergestellt. Der Konzentrationsbereich lag zwischen 980 und 6380 $\mu\text{mol/l}$ (Tab. 15). Die Phospholipide wurden mit der Molybdat/Vanadat-Reaktion bestimmt und aus den authentischen und gemessenen Konzentrationen wurde die Wiederfindungsrate berechnet. Im gewählten Konzentrationsbereich betrug die mittlere Wiederfindungsrate 65,9% und die Standardabweichung $\pm 6,34\%$. Abbildung 9 I. stellt die Eichkurve der Phospholipide dar. Es sind die authentischen gegen die gemessenen Konzentrationen aufgetragen.

7 Enzymatische Bestimmung der Triglyceride nach Verseifung (nach EGGSTEIN und KREUTZ)

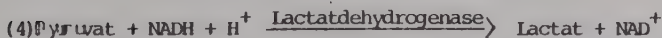
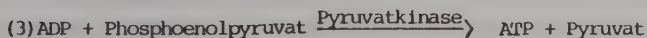
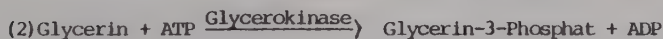
7.1 Prinzip

Die Triglyceride werden nach Verseifung mit äthanolischer Kalilauge durch einen enzymatisch-optischen Test bestimmt. Im folgenden Schema ist der Reaktionsablauf dargestellt:

1. Schritt:



2. Schritt:



Im ersten Schritt findet die alkalische Verseifung der Triglyceride statt. Als Endprodukte entstehen Glycerin und die Salze der Fettsäuren (1).

Im zweiten Schritt erfolgt die Bestimmung des Glycerins durch einen enzymatisch-optischen Test. Glycerin wird durch Glycerokinase in Anwesenheit von Adenosin-Triphosphat phosphoryliert und es entsteht L (-)-Glycerin-3-Phosphat (2)

und Adenosin-Diphosphat. Dieses reagiert mit Phosphoenolpyruvat unter Einwirkung des Hilfsenzym Pyruvatkinase zu Adenosin-Triphosphat und Pyruvat (3). Das gebildete Pyruvat wird durch Lactatdehydrogenase in Anwesenheit von NADH_2 zu Lactat reduziert. Dabei wird eine der Glycerophosphatbildung äquivalente Menge von NADH_2 zu NAD^+ oxydiert (4). NADH_2 hat ein Absorptionsmaximum bei 340nm, während NAD bei dieser Wellenlänge keine Absorption zeigt. Daher ist die Abnahme der Extinktion bei 340nm ein Maß für die Oxydation von NADH_2 .

7.2 Reagenzien und Lösungsmittel

Die Bestimmung wurde mit den Reagenzien der Triglycerid-Test-Packung der Firma Boehringer Mannheim (Best.-Nr. 125053) durchgeführt.

- Lösung 1: Puffer

Triäthanolamin-Puffer	0,2mol/l; pH 7,6
MgSO_4	4mmol/l

- Lösung 2: $\text{NADH}/\text{ATP}/$ PEP

6mmol/l; 33mmol/l

- Suspension 3: LDH/PK

➤ 800U/ml; ➤ 130U/ml

- Suspension 4: GK

➤ 150U/ml

PEP = Phosphoenolpyruvat

LDH = Lactat-Dehydrogenase

PK, = Pyruvat-Kinase

GK = Glycerokinase

Äthanolische Kalilauge 0,5N (Fa. Boehringer Mannheim,
Best.-Nr. 125296)

Magnesiumsulfatlösung 0,15mmol/l (Fa. BOEHRINGER Mannheim,
Best.-Nr. 125318)

7.3 Durchführung

Die Durchführung der Bestimmung erfolgte nach Vorschrift der Test-Packung der Firma Boehringer Mannheim. Zu 0,2ml EDTA-Plasma werden 0,5ml äthanolische Kalilauge zugegeben und ge-

mischt. Das Reagenzglas wird mit Parafilm verschlossen. Die Probe wird für 20 Minuten bei 70°C im Wasserbad inkubiert und danach auf 20 - 25°C abgekühlt. Dazu wird 1ml Magnesiumsulfatlösung gegeben, gemischt, zentrifugiert und 0,5ml des klaren Überstandes zur Bestimmung entnommen. Durch die Kalilauge-Lösung erfolgt die Verseifung der Triglyceride. Die Magnesiumsulfat-Lösung dient zur Neutralisierung der Probe auf pH 7.

In eine Küvette werden 2,40ml aus der Lösung 1, 0,1ml aus der Lösung 2, 0,5ml aus dem Überstand der Probe und 0,02ml aus der Suspension 3 pipettiert, gemischt und für 10 Minuten bei 20 - 25°C inkubiert. Danach wird die Extinktion (E_1) von NADH_2 bei 340nm mit Hilfe eines Eppendorff-Photometers gemessen. In die Küvette werden dann 0,002ml aus der Suspension 4 zugegeben und damit startet unter Einwirkung der Glycerokinase die eigentliche Reaktion (Gleichung 1 - 4, s. Seite 24). Nach der Zugabe der Suspension 4 wird die Probe gemischt und nach 10 Minuten die Extinktion (E_2) von NADH_2 bei 340nm gemessen. Die Extinktionsabnahme $\Delta E = E_1 - E_2$ entspricht der Menge von NADH_2 , die zu NAD oxydiert wird. Diese Menge ist der Triglyceride-Menge äquivalent. In jedem Versuch wird eine Leerwert-Probe aus destilliertem Wasser mitgeführt.

7.4 Quantitative Auswertung

Die Konzentration der Triglyceride wird nach folgenden Formeln berechnet:

$$1. \quad C_{\text{TG}} = 8,20 \times \Delta E \quad (\text{mmol/l})$$

$$2. \quad \Delta E = E_1 - E_2 - E_{\text{RL}}$$

$$3. \quad E_{\text{RL}} = E_{1\text{RL}} - E_{2\text{RL}}$$

C_{TG} = Konzentration der Triglyceride

E_1 = Extinktion der Probe vor der Zugabe der Suspension 4

- E_2 = Extinktion der Probe nach der Zugabe der Suspension 4
- E_{1RL} = Extinktion der Leerwert-Probe vor der Zugabe der Suspension 4
- E_{2RL} = Extinktion der Leerwert-Probe nach der Zugabe der Suspension 4

In der Test-Packung ist vorgeschrieben, daß bei einer höheren Extinktionsdifferenz (ΔE) als 0,800 das Lambert-Beer'sche Gesetz nicht mehr zutrifft. Das EDTA-Plasma muß dann mit einer Natriumchlorid-Lösung 0,9% (Fa. Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 125326) im Verhältnis 1:10 verdünnt werden. Die Extinktionsdifferenz (ΔE) wird mit 10 multipliziert.

7.5 Standardabweichung bei der Triglycerid-Bestimmung

Durch 12 Bestimmungen der Triglyceride im selben Plasma und in den Lipoproteinfractionen wurde die Reproduzierbarkeit der Werte festgestellt (Tab. 16 - 17). Die mittlere Konzentration für die Gesamt-Triglyceride im Plasma betrug 1552 $\mu\text{mol/l}$ und die Standardabweichung $\pm 44,28 \mu\text{mol/l}$ (Tab. 16), für die VLDL-Triglyceride 668 $\pm 43,30 \mu\text{mol/l}$, für die LDL-Triglyceride 422 $\pm 55,08 \mu\text{mol/l}$ und für die HDL-Triglyceride 234 $\pm 42,10 \mu\text{mol/l}$ (Tab. 17).

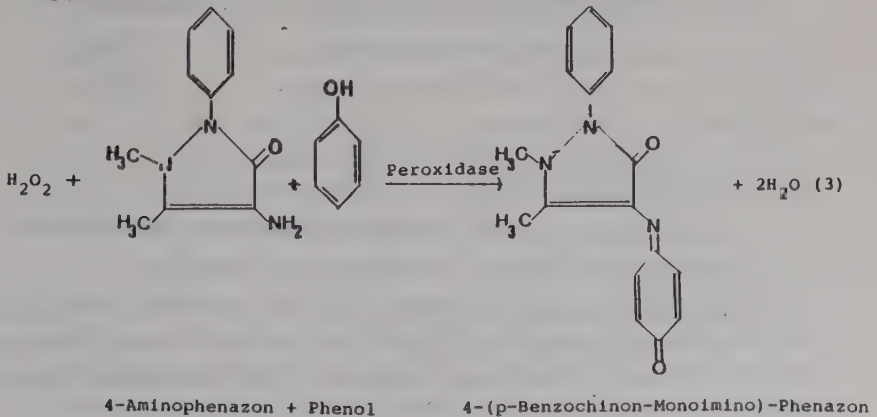
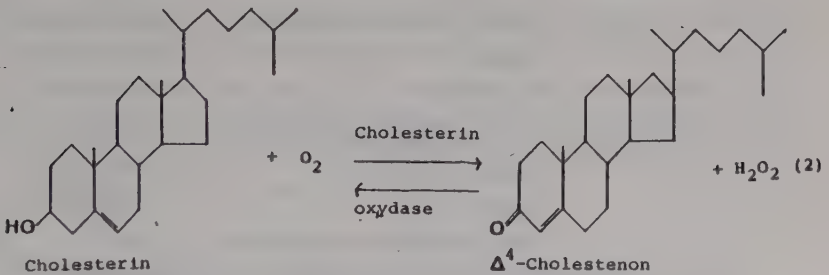
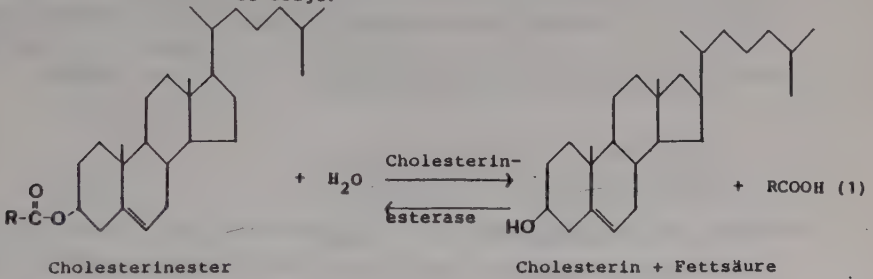
Für die Ermittlung der Wiederfindungsrate wurden 5 Triglycerid-Lösungen mit bekannten Konzentrationen im Bereich zwischen 612 und 2067 $\mu\text{mol/l}$ hergestellt (Tab. 15) und die Triglyceride bestimmt. Die mittlere Wiederfindungsrate im gewählten Konzentrationsbereich betrug 90,2% und die Standardabweichung $\pm 1,39\%$ (Tab. 15).

Aus den Werten der gemessenen und authentischen Triglycerid-Konzentrationen wurde eine Eichkurve gezeichnet (Abb. 9 I.), die im Konzentrationsbereich zwischen 612 und 2067 $\mu\text{mol/l}$ linear war.

8 Enzymatische Bestimmung des Cholesterins (nach der CHOD-PAP Methode) (RÖSCHLAU 1974)

8.1 Prinzip

Der Reaktionsmechanismus bei der Bestimmung des Cholesterins verläuft wie folgt:



Im Plasma liegt Cholesterin z.T. als Fettsäureester vor. Daher muß dieser Teil durch Cholesterinesterase hydrolysiert werden (1). Dann wird das gesamte Cholesterin durch Cholesterinoxidase zu Δ^4 -Cholestenon oxydiert (2). Dabei entsteht pro Mol oxydierten Cholesterins ein Mol Wasserstoffperoxid. Dieses H_2O_2 wird mit Hilfe von Peroxidase bestimmt, indem nach TRINDER (1969) aus 4-Aminophenazon (4-Amino-antipyrin, PAP) und Phenol das rotgefärbte Chromogen 4-(p-Benzochinon-Monoimino)-Phenazon (3) gebildet wird. Die Extinktion des Chromogens wird bei 546nm mit Hilfe eines Eppendorf-Photometers gemessen.

8.2 Reagenzien und Lösungsmittel

Die Bestimmung wurde mit den Reagenzien der Cholesterin-Test-Packung der Fa. Boehringer Mannheim (Best.-Nr. 172626) durchgeführt.

- Lösung 1: Puffer (Kaliumphosphat)	0,4mol/l; pH 7,7
Phenol	20mmol/l
Methanol	1,85mol/l
- Lösung 2: Puffer (Kaliumphosphat)	0,4mol/l; pH 7,7
4-Aminophenazon	2mmol/l
Methanol	1,85mol/l
Hydroxypolyäthoxydodecan	0,4%
- Lösung 3: Cholesterin-Esterase	40 U/ml
Cholesterin-Oxidase	12 U/ml
Peroxidase	8 U/ml

8.3 Durchführung

Die Durchführung der Bestimmung erfolgte nach Vorschrift der Testpackung der Fa. Boehringer Mannheim.

Es wird Lösung 4 hergestellt, die von 5ml aus der Lösung 1, 5ml aus der Lösung 2 und 0,05ml aus der Lösung 3 besteht. Zu 0,02ml EDTA-Plasma werden 2ml aus der Lösung 4 zugegeben,

gemischt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. In jedem Versuch wird eine Leerwert-Probe mitgeführt. Nach dem Inkubieren wird innerhalb von 2 Stunden die Extinktion der Probe bei 546nm gegen den Leerwert mit Hilfe eines Eppendorf-Photometers gemessen.

8.4 Quantitative Auswertung

Die Konzentration des Cholesterins wurde nach folgender Formel berechnet:

$$C_{\text{CHOL}} = 22,1 \times E_p \quad (\text{mmol/l})$$

C_{CHOL} = Konzentration des Cholesterins

E_p = Extinktion der Probe

Nach Vorschrift der Test-Packung trifft das Lambert-Beer'sche-Gesetz bei einer Cholesterin-Konzentration höher als 12,9mmol/l nicht mehr zu. Dann muß 0,1ml Probenmaterial mit 0,2ml Natriumchlorid-Lösung 0,9% (Fa. Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 125326) verdünnt und das Ergebnis mal 3 multipliziert werden.

8.5 Standardabweichung bei der Bestimmung des Cholesterins

Tabelle 16 - 17 zeigt die Werte des Cholesterins bei 12 Bestimmungen im selben Plasma und in 3 Lipoproteinfraktionen. Die mittlere Konzentration im Cholesterin im Plasma betrug 4097 $\pm$ 107,5 μ mol/l, davon in der VLDL-Fraktion 260 $\pm$ 11,95 μ mol/l, in der LDL-Fraktion 2393 $\pm$ 81,81 μ mol/l und in der HDL-Fraktion 1408 $\pm$ 169,05 μ mol/l.

Die Wiederfindungsrate wurde ermittelt, indem 5 Cholesterin-ester-Lösungen bekannter Konzentrationen im Bereich zwischen 1063 und 5380 μ mol/l (Tab. 15) hergestellt wurden und das Cholesterin bestimmt wurde. Aus den authentischen und gemessenen Konzentrationen wurde die Wiederfindungsrate berechnet. Bei einer mittleren Wiederfindungsrate von .90% betrug die Standardabweichung $\pm$ 2,09%.

Abbildung 9.II. gibt die Eichkurve für das Cholesterin wieder. Sie verläuft im gewählten Konzentrationsbereich linear.

9 Bestimmung anderer Plasmaparameter

Die Bestimmung von Plasma-Kalium, Plasma-Natrium, Plasma-Kreatinin, Plasma-Harnsäure, Plasma-Protein, Blut-Glucose und Hämatokrit erfolgte im Zentrallabor des Klinikums Steglitz im täglichen Routineprogramm.

10 Statistische Auswertung

Die Auswertung erfolgte aufgrund des Vergleichs der Mittelwerte ($\bar{x}$ = arithmetisches Mittel) unter Berücksichtigung der Standardabweichungen (s = Standardabweichung) und der Variationskoeffizienten (VK = Variationskoeffizient), die nach folgenden Formeln ermittelt wurden:

$$1. \quad \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$2. \quad s = \frac{\sum (\bar{x} - x)^2}{n - 1}$$

$$3. \quad VK = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

n = Stichprobenumfang

x = Einzelwert

Versuch A:

Von jedem der 12 Probanden wurden für jede der 3 Behandlungsperioden 3 und für die Placeboperiode 4 Einzelwerte zur Bildung der 4 Mittelwerte herangezogen.

Der 1. Einzelwert jeder Behandlungsperiode wurde 1 Woche nach Behandlungsbeginn bestimmt, der 2. und 3. nach 2 und 3 Wochen. Der 4. Wert in der Placeboperiode kommt dadurch zustande, daß jeder der 3 Behandlungsperioden eine behandlungsfreie Woche folgte. Diese Periodik mußte auch für

die Placebobehandlung gelten, jedoch konnte hier der Wert nach der behandlungsfreien Woche zusätzlich für die Bildung des Mittelwertes herangezogen werden.

Versuch B:

Es wurden für jede der 3 Behandlungs-Perioden mit verschiedenen Dosen zwei Mittelwerte gebildet, die in den Tabellen 25 - 27 aufgeführt sind. Die beiden Mittelwerte wurden aus 5 und 3 Einzelwerten von jedem der 8 Probanden gebildet. Die 5 Einzelwerte wurden jeweils an den 5 Behandlungstagen und die 3 an den 3 behandlungsfreien Tagen bestimmt. Als behandlungsfreie Tage galten der Tag vor dem Beginn und die 2 Tage nach der Beendigung der Behandlung. In den Tabellen 25 - 27 steht der Mittelwerte der behandlungsfreien Tage in der mit "vor" und der Mittelwert der Behandlungstage in der mit "nach" bezeichneten Spalte.

Versuch C:

Von jedem der 6 Patienten wurden für jede der beiden Perioden, der Hydrochlorothiazid- und Placebo-Periode, 7 Einzelwerte zur Bildung der 2 Mittelwerte herangezogen. Für jede der beiden Perioden wurde der erste Einzelwert 3 Tage nach Beginn und danach 2 mal pro Woche bestimmt.

Versuch D:

Für diese Untersuchung standen nur 2 Patienten mit Hyperlipoproteinämie zur Verfügung, die bereit waren, sich der 2-monatigen Behandlung und Beobachtung zu unterziehen.

3 Dosen - 50, 100 und 150mg Hydrochlorothiazid als einmalig verabfolgte Tagesdosen - wurden für 11 bzw. 12 Tage gegeben. Zwischen den Dosen lagen 15 - 18 behandlungsfreie Tage. Für jede Behandlungs- und behandlungsfreie Periode wurde jeweils ein Mittelwert gebildet. Die zur Bildung der

Mittelwerte herangezogenen Einzelwerte wurden jeden 2. Tag aus dem Nüchternblut ermittelt. Bei der 100mg-Dosierung wurde zusätzlich 1 Wert und bei der 150mg Dosierung 2 Werte gemessen.

Versuch E:

An diesem Versuch nahmen 10 Raucher teil. Aus den 10 Lipidwerten vor dem Rauchen der Zigaretten wurde der Mittelwert gebildet und mit dem Mittelwert aus den 10 Lipidwerten nach dem Rauchen verglichen.

Für Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Medikament-Periode und denen der Kontrollperiode wurde mit dem t-Test nach STUDENT für gepaarte Meßwerte die Irrtumswahrscheinlichkeit berechnet. Für jeden Patienten wurde der Mittelwert aus den Einzelwerten der Medikament-Periode und derjenige aus den Einzelwerten der Kontroll-Periode ermittelt, so daß sich für jeden einzelnen Patienten aus diesen beiden Mittelwerten ein Meßwert-Paar ergab. Signifikanzen wurden bei einem p-Wert $< 0,05$ angenommen.

Zur Prüfung von Korrelationen zwischen verschiedenen Parametern wurden Regressionsanalysen durchgeführt. Dazu wurden die folgenden Gleichungen verwendet:

$$1. y = a_1 x + a_0$$

y = Regressionsgerade

a_1 = Steigung der Gerade
(Regressionskoeffizient)

a_0 = der Abschnitt auf der Ordinatenachse ($x = 0$)

Das Maß, ob die Gleichung 1. die Beziehung zwischen den Variablen x und y am besten wiedergibt, ist der Korrelationskoeffizient. Der Korrelationskoeffizient wurde nach folgender Formel berechnet:

$$2. r = \frac{S_{xy}}{S_x S_y}, \text{ wobei } S_{xy} \text{ die Kovarianz ist}$$

$$3. S_{xy} = \frac{1}{n-1} \left(\sum x_i y_i - \frac{1}{n} \sum x_i \sum y_i \right)$$

S_x und S_y sind folgende Standardabweichungen:

$$4. S_x = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2/n}{n-1}}$$

$$5. S_y = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - (\sum y_i)^2/n}{n-1}}$$

r = Korrelationskoeffizient

x_i = Einzelwert von der Variablen x
($i = 1, 2 \dots n$)

y_i = Einzelwert von der Variablen y
($i = 1, 2 \dots n$)

Tabelle 1: Alter, Gewicht, Größe der 12 Probanden, die am Versuch A teilnahmen
($\bar{x}$ = arithm. Mittel; s = Standardabweichung)

Proband	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Größe (cm)
BF	27	79,50	183
BT	26	66,37	171
BR	20	61,75	175
HM	27	69,00	176
HN	32	78,13	182
HK	26	75,88	185
HB	31	71,25	178
JC	29	68,75	177
JG	25	71,00	173
PK	26	77,00	179
RT	28	82,25	184
WL	27	80,75	183
$\bar{x} \pm s$	27,0 $\pm$ 3,1	73,5 $\pm$ 6,4	178,8 $\pm$ 5,6

Tabelle 2: Alter, Gewicht, Größe der Probanden, die am Versuch B teilnahmen
($\bar{x}$ = arithm. Mittel; s = Standardabweichung)

Proband	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Größe (cm)
BR	27	67,70	177
GA	29	67,90	176
HE	28	82,75	183
HI	32	76,15	180
RE	21	65,55	172
BA	27	82,80	183
WE	29	88,30	186
KR	33	83,10	182
TA	24	73,80	178
BE	26	86,10	184
FR	25	70,90	176
HA	31	73,30	175
$\bar{x} \pm s$	27,7 $\pm$ 3,5	76,5 $\pm$ 7,8	179,3 $\pm$ 4,3

Tabelle 3: Typ der Hyperlipoproteinämie, Alter, Gewicht, Größe und letzter Nüchternplasma-Wert des Gesamtcholesterins und der Gesamttriglyceride bei 6 Patienten mit Hyperlipoproteinämie ($\bar{x}$ = arithm. Mittel; s = Standardabweichung)

Patient	Hyperlipoproteinämie	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Größe (cm)	letzter Nüchternplasma-Wert ($\mu\text{mol/l}$) ¹⁾
E.R.	II _b	51	80,40	180	7490
K.O.	IV	34	71,85	162	5260
P.O.	II _b	26	86,50	183	10600
S.E.	II _b	23	79,10	175	7320
T.U.	IV	60	82,55	170	5290
W.A.	IV	44	105,00	171	5800
$\bar{x} \pm s$		39,7 $\pm$ 14,5	84,2 $\pm$ 11,3	173,5 $\pm$ 7,6	2810
					2430
					2970
					1970
					2300
					4540

1) Normalbereich für verschiedene Alterklassen bei Männern:

Alter (Jahre)	Gesamtcholesterin ⁺ mg/100ml	Gesamttriglyceride ⁺⁺ mg/100ml	Alter (Jahre)	Gesamttriglyceride ⁺⁺ $\mu\text{mol/l}$
< 20	110 - 220	< 30	< 30	< 150
< 30	120 - 250	30 - 40	30 - 40	< 170
< 40	135 - 270	40 - 50	40 - 50	< 1824
< 50	150 - 300	50 - 60	50 - 60	< 2166
< 60	140 - 280			
< 70	140 - 270			

++ aus: Praxis Laboratorium, K. Leybold - E. Grabener, 7. Aufl. (1976), Georg Thieme-Verlag, Stuttgart.

+ aus: K. Seilnacht, Laborfibel, Werk-Verlag Dr. Edmund Banaschewski, München - Grafelfing (1977).

Tabelle 4: Alter, Gewicht, Größe und letzter Nüchternplasma-Wert des Gesamtcholesterins und der Gesamttriglyceride bei 2 Patienten mit Hyperlipoproteinämie vom Typ IV

Patient	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Größe (cm)	letzter Nüchternplasma-Wert (μ mol/l)	
				Ges.-Cholesterin	Ges.-Triglyceride
LO	48	82,00	181	4840	1980
WE	36	90,00	182	5000	6820

Tabelle 5: Alter, Gewicht und Größe von 10 Rauchern, die
am Versuch E teilnahmen
($\bar{x}$ = arithm. Mittel; s = Standardabweichung)

Proband	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Größe (cm)
E.R.	51	80,40	180
P.O.	26	86,50	183
S.E.	23	79,10	175
W.A.	44	105,00	171
D.I.	30	68,60	173
S.U.	28	71,00	176
W.G.	30	73,20	174
S.L.	31	72,30	177
R.E.	33	71,00	169
H.I.	33	73,00	176
$\bar{x} \pm s$	32,9 $\pm$ 8,5	78,0 $\pm$ 10,9	175,4 $\pm$ 4,1

Tabelle 6: Klinische Untersuchungen und Blutanalysen

<u>1. Klinische Untersuchungen</u>	
1. Anamnese	
2. Blutdruck nach Riva-Rocci	
3. Pulsfrequenz	
4. Körpergewicht	
<u>2. Blutanalysen</u>	
1. Freie Fettsäuren	
2. Triglyceride im Plasma und in den drei Plasmalipoproteinfraktionen VLDL, LDL, HDL	
3. Cholesterin	" " " "
4. Phospholipide	" " " "
5. Plasma-Natrium	" " " "
6. Plasma-Kalium	" " " "
7. Plasma-Kreatinin	" " " "
8. Plasma-Harnsäure	" " " "
9. Blut-Glucose	" " " "
10. Plasma-Protein	" " " "
11. Hämatokrit	" " " "

Tabelle 7: 12-fache Bestimmung der Palmitin-(C₁₆), Stearin-(C₁₈), Öl-(C_{18:1}) und Linolsäure (C_{18:2}) aus einem menschlichen Serum. ($\bar{x}$ = arithm. Mittel; s = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient)

Nr.	C ₁₆ (/umol/l)	C ₁₈ (/umol/l)	C _{18:1} (/umol/l)	C _{18:2} (/umol/l)
1.	203	68	197	108
2.	215	80	211	125
3.	244	104	217	135
4.	208	77	209	116
5.	221	79	216	123
6.	222	77	212	124
7.	211	80	198	117
8.	220	90	211	117
9.	205	76	225	112
10.	212	77	203	122
11.	221	82	210	120
12.	199	68	196	109
$\bar{x} \pm s$	215 $\pm$ 11,91	80 $\pm$ 9,59	209 $\pm$ 8,82	119 $\pm$ 7,57
VK	5,5%	12%	4,2%	6,4%

Tabelle 8: Authentische und gaschromatographisch gemessene Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ von jeweils 3 Lösungen der Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäure.

($\bar{x}$ = arithm. Mittel; s = Standardabweichung)

Fettsäure	authent. Konzentr. ($\mu\text{mol/l}$)	gemessene Konzentr. ($\mu\text{mol/l}$)	Wiederfindung %
C ₁₆	250	214	85,5
unver-	200	168	84,0
estert	150	128	85,0
			$\bar{x} \pm s$ 84,8 $\pm 0,76$
C ₁₈	100	80	80,0
unver-	75	57	76,0
estert	50	37	74,0
			$\bar{x} \pm s$ 76,7 $\pm 3,10$
C _{18:1}	175	136	77,7
unver-	150	114	76,0
estert	125	97	77,6
			$\bar{x} \pm s$ 77,1 $\pm 0,95$
C _{18:2}	125	90	72,0
unver-	100	71	71,0
estert	75	57	76,0
			$\bar{x} \pm s$ 73,0 $\pm 2,66$

Tabelle 9: Authentische und gaschromatographisch gemessene Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ von jeweils 3 Lösungen des Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linölsäuremethylesters
($\bar{x}$ = arithm. Mittel; s = Standardabweichung)

Fettsäure	authent. Konzentr. ($\mu\text{mol/l}$)	gemessene Konzentr. ($\mu\text{mol/l}$)	Wiederfindung %
C ₁₆	250	235	94,0
ver-	200	188	94,0
estert	150	140	93,3
			$\bar{x} \pm s$ 93,8 $\pm$ 0,40
C ₁₈	100	103	103,0
ver-	75	74	98,1
estert	50	46	92,0
			$\bar{x} \pm s$ 97,9 $\pm$ 5,54
C _{18:1}	175	177	101,1
ver-	150	149	99,3
estert	125	126	100,8
			$\bar{x} \pm s$ 100,4 $\pm$ 0,96
C _{18:2}	125	122	97,6
ver-	100	98	98,0
estert	75	76	101,3
			$\bar{x} \pm s$ 98,97 $\pm$ 2,03

Tabelle 10: Dünnschichtchromatographische Parameter bei der Auftrennung der Phospholipide

<u>Trennprinzip:</u>	Absorptionschromatographie
<u>Stationäre Phase:</u>	Kieselgel in Form von Kieselgelplatten mit Schichtdicke 0,25mm (Fa. Merck, Darmstadt)
<u>Mobile Phase:</u>	Chloroform : Aceton : Methanol : Essigsäure : Wasser im Verhältnis 50 : 20 : 10 : 10 : 5
<u>Laufrichtung:</u>	aufsteigend, eindimensional
<u>Laufstrecke:</u>	15 cm

Tabelle 11: Rf-Werte der Phospholipide bei unterschiedlichen Laufmitteln. Folgende Laufmittel wurden verwendet:

Laufmittel I:

Chloroform:Aceton:Methanol:Essigsäure:Wasser
50 : 20 : 10 : 10 : 5

Laufmittel II:

Chloroform : Methanol : Wasser
65 : 25 : 3

Phospholipid	Rf	
	Laufmittel I	Laufmittel II
Phosphatidylcholin	0,31	0,16
Sphingomyelin	0,26	0,10
Lysophosphatidylcholin	0,11	0,06

Tabelle 12: 6 Bestimmungen im gleichen Plasma von Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin (SPH), Lysophosphatidylcholin (LPC) und Phosphatidyläthanolamin (PE)
($\bar{x}$ = mittlere Konzentration; s = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient)

Nr.	PC ($\mu\text{mol/l}$)	SPH ($\mu\text{mol/l}$)	LPC ($\mu\text{mol/l}$)	PE ($\mu\text{mol/l}$)
1.	1107	500	198	69,7
2.	1449	482	180	82,4
3.	1449	495	204	63,4
4.	1412	497	188	95,1
5.	1455	474	237	77,4
6.	1368	437	209	75,5
$\bar{x} \pm s$	1373 $\pm$ 134,59	481 $\pm$ 23,66	203 $\pm$ 19,86	77,3 $\pm$ 10,93
VK	9,80%	4,72%	9,78%	14,14%

Tabelle 13: Authentische und gemessene Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ von jeweils 4 Lösungen des Phosphatidylcholins (PC), des Sphingomyelins (SPH), des Lysophosphatidylcholins (LPC) und des Phosphatidyläthanolylamins (PE)
($\bar{x}$ = arithm. Mittel; s = Standardabweichung)

Phospholipide	authent. Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	gemessene Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	Wiederfindungsrate %
PC	1635	1455	89,0
	1090	1014	93,0
	763	616	80,7
	218	218	100,0
			$\bar{x} \pm s$ 90,7 $\pm$ 8,06
SPH	1664	1378	82,8
	1109	976	88,0
	778	653	83,9
	222	211	95
			$\bar{x} \pm s$ 87,4 $\pm$ 5,52
LPC	48	34	73
	100	78	78
	145	127	86
	193	180	93
			$\bar{x} \pm s$ 82,5 $\pm$ 8,81
PE	60	43	72
	90	80	89
	120	95	79
	150	142	95
			$\bar{x} \pm s$ 83,8 $\pm$ 10,24

Tabelle 14: Mittlere Konzentration ($\bar{x}$), Standardabweichung (s) und Variationskoeffizient (VK) einer 12-fachen Bestimmung der Gesamttriglyceride, des Gesamtcholesterins und der Gesamtphospholipide

Nr.	Ges.-Trigl. ($\mu\text{mol/l}$)	Ges.-Chol. ($\mu\text{mol/l}$)	Ges.-Phosph. ($\mu\text{mol/l}$)
1.	1490	4150	5950
2.	1540	3930	6050
3.	1550	4150	6050
4.	1660	3970	6330
5.	1600	3990	6200
6.	1540	4150	6050
7.	1580	4240	6290
8.	1530	4120	6140
9.	1550	4240	6050
10.	1540	4110	6180
11.	1520	3960	6100
12.	1520	4150	5950
$\bar{x} \pm s$	1552 $\pm$ 44,28	4097 $\pm$ 107,48	6112 $\pm$ 120,74
VK	2,85%	2,62%	1,98%

Tabelle 15: Authentische und gemessene Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ von jeweils 5 Lösungen der Phospholipide (PHOS), Triglyceride (TG) und des Cholesterins (CHOL)
($\bar{x}$ = arithm. Mittel; s = Standardabweichung)

Lipide	authent. Konzentr. ($\mu\text{mol/l}$)	gemessene Konzentr. ($\mu\text{mol/l}$)	Wiederfindungs- rate %
PHOS	6380	3740	58,6
	3940	2490	63,2
	2590	1660	64,1
	1630	1110	68,1
	980	740	75,5
			$\bar{x} \pm s$ 65,9 $\pm$ 6,34
TG	2067	1870	90,5
	1378	1250	90,7
	919	840	91,4
	612	540	88,2
			$\bar{x} \pm s$ 90,2 $\pm$ 1,39
CHOL	5380	4710	87,6
	3587	3240	90,3
	2391	2190	91,6
	1594	1480	92,9
	1063	980	92,1
			$\bar{x} \pm s$ 90,9 $\pm$ 2,07

Tabelle 16: Mittlere Konzentration ($\bar{x}$), Standardabweichung (s) und Variationskoeffizient (VK) einer 12-fach-Bestimmung der Triglyceride in den VLDL, LDL und HDL

Nr.	VLDL-Trigl. ($\mu\text{mol/l}$)	LDL-Trigl. ($\mu\text{mol/l}$)	HDL-Trigl. ($\mu\text{mol/l}$)
1.	640	370	240
2.	630	400	330
3.	680	390	270
4.	750	360	270
5.	710	360	240
6.	710	460	190
7.	620	510	190
8.	620	510	200
9.	630	480	220
10.	700	390	220
11.	640	410	250
12.	680	420	190
$\bar{x} \pm s$	668 $\pm 43,30$	422 $\pm 55,08$	234 $\pm 42,10$
VK	6,48%	13,05%	17,99%

Tabelle 17: Mittlere Konzentration ($\bar{x}$), Standardabweichung (s) und Variationskoeffizient (VK) einer 12-fach-Bestimmung des Cholesterins in den VLDL, LDL und HDL

Nr.	VLDL-Chol. ($\mu\text{mol/l}$)	LDL-Chol. ($\mu\text{mol/l}$)	HDL-Chol. ($\mu\text{mol/l}$)
1.	260	2490	1430
2.	310	2300	1770
3.	250	2320	1560
4.	240	2270	1580
5.	330	2270	1400
6.	260	2430	1230
7.	220	2440	1250
8.	240	2490	1240
9.	250	2440	1340
10.	240	2380	1400
11.	250	2450	1480
12.	270	2430	1220
$\bar{x} \pm s$	260 $\pm 11,94$	2393 $\pm 81,81$	1408 $\pm 169,05$
VK	4,59%	3,40%	12,00%

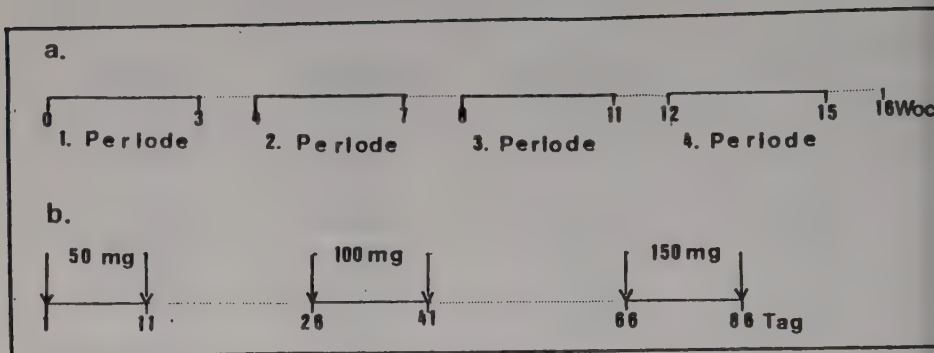


Abb. 1:

a. Versuchsablauf-Schema des Versuchs A

Der Versuch gliedert sich in 4 Behandlungsperioden von jeweils 3 Wochen (—). Zwischen den Behandlungsperioden liegt jeweils eine Woche ohne Medikament (---). Die zwölf Probanden wurden den folgenden 4 Medikament-Gruppen nach der cross-over-Anordnung zugeordnet: der Hydrochlorothiazid-, der Chlorthalidon-, der Furosemid- und der Placebo-Gruppe.

b. Versuchsablauf-Schema des Versuchs D

Es wurden über 11 Tage 50mg Hydrochlorothiazid und jeweils über 12 Tage 100 und 150mg Hydrochlorothiazid verabreicht. Die durch die beiden senkrechten Pfeile markierten Bereiche umfassen die Hydrochlorothiazid-Tage. Zwischen ihnen liegen die medikamentfreien Tage (---).

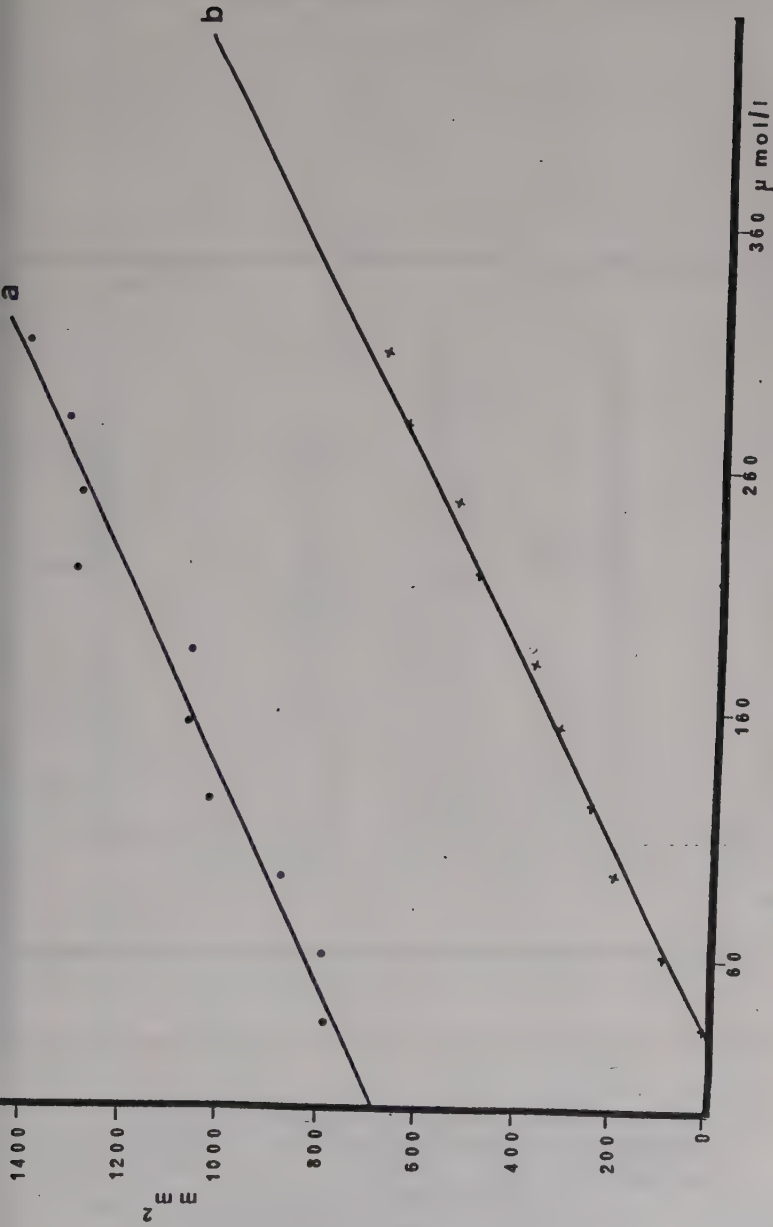


Abb. 2: Aufgetragen ist die authentische Konzentration von Palmitinsäure in $\mu\text{mol/l}$ gegen die Peakfläche von Palmitinsäure in mm^2 . Dabei ist einmal C_{16} in Essigsäureäthylester- (Kurve a.) zum anderen in Methyljodid/Essigsäureäthylester-Lösung (Kurve b.) gelöst.

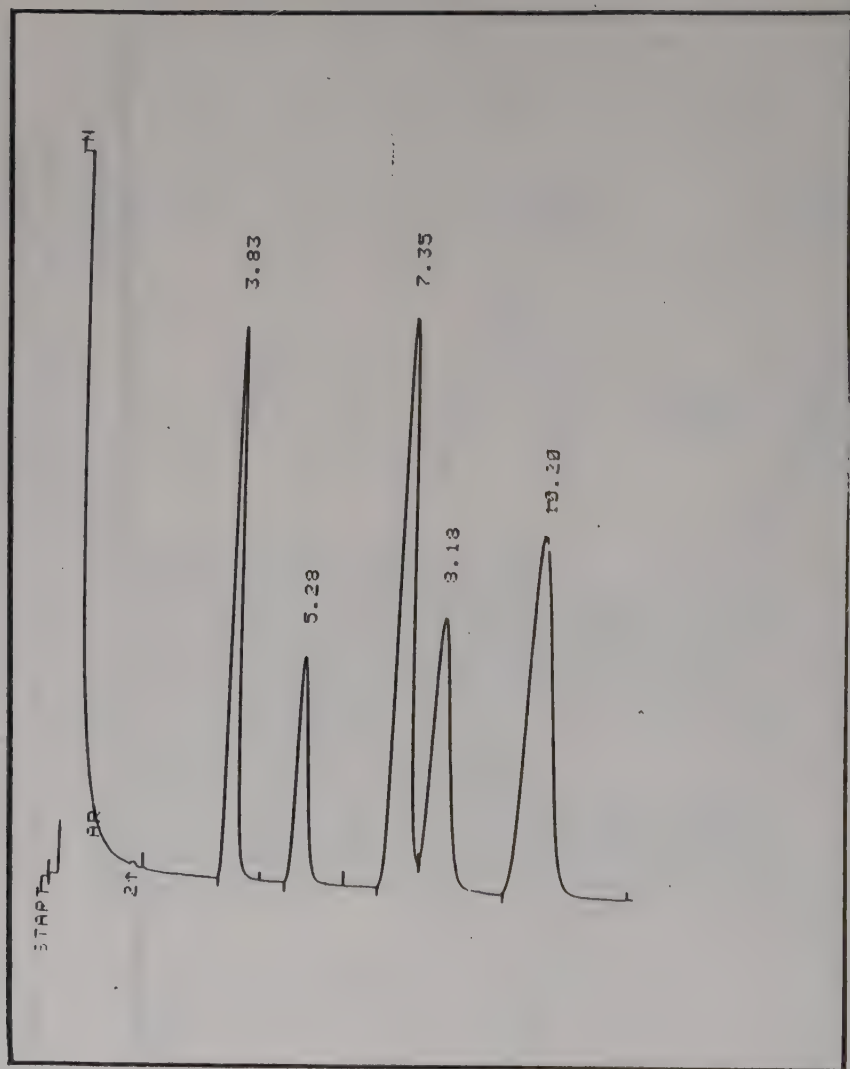


Abb. 3: Gaschromatogramm aus einem Gemisch von Fettsäuren-methylestern. Von links nach rechts: Palmitinsäure (C_{16}), Margarinsäure (C_{17}), Stearinsäure (C_{18}), Ölsäure ($C_{18:1}$) und Linolsäure ($C_{18:2}$).

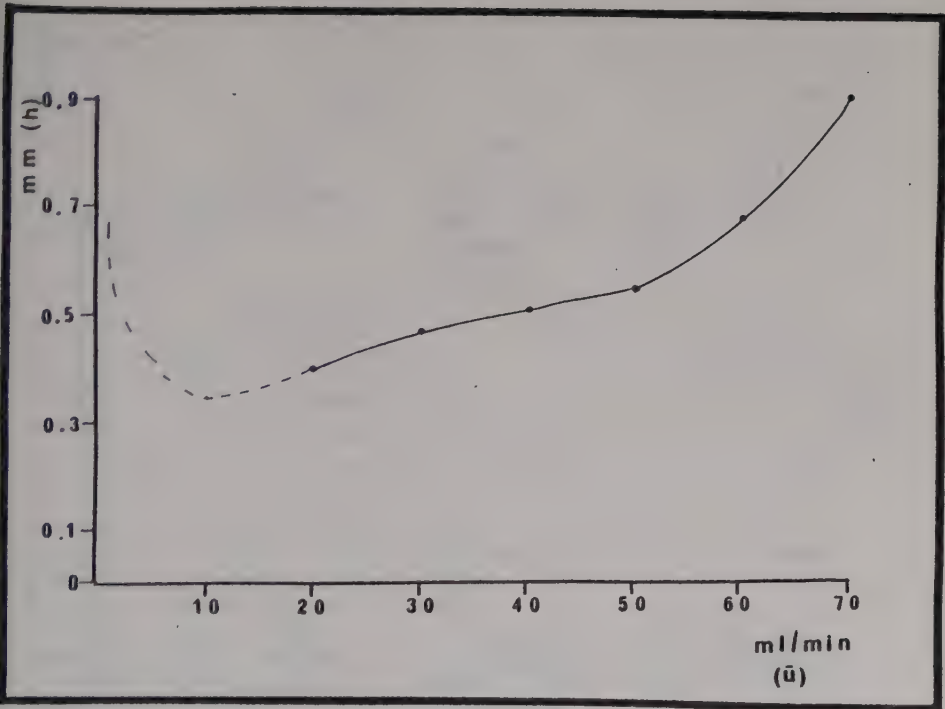


Abb. 5: Darstellung der HETP- $\bar{u}$ -Kurve.
 h = Bodenhöhe (mm); $\bar{u}$ = Trägergasgeschwindigkeit (ml/min).

I. (veresterte Fettsäuren)

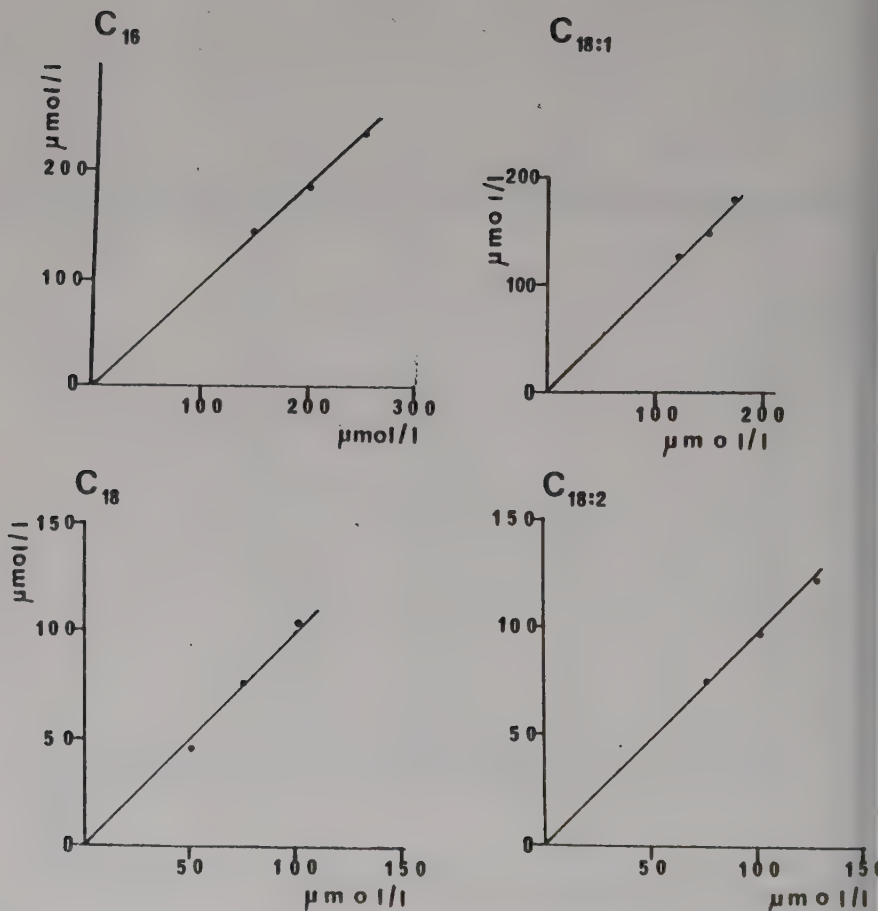
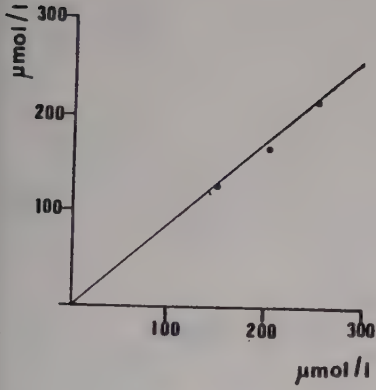


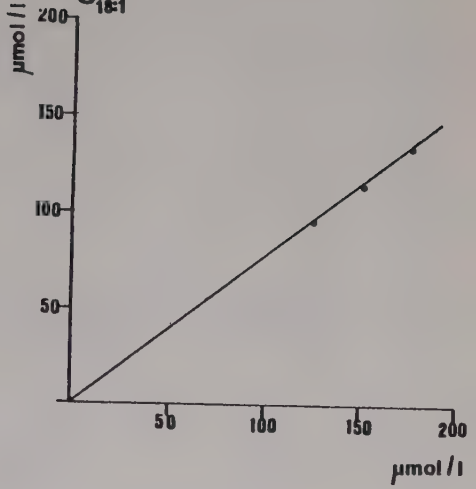
Abb. 6 I., II: Eichkurven der veresterten (I) und unveresterten (II) Fettsäuren. Es sind die authentischen Werte der Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäure gegen die gaschromatographisch gemessenen Werte aufgetragen.

II. (unveresterte Fettsäuren)

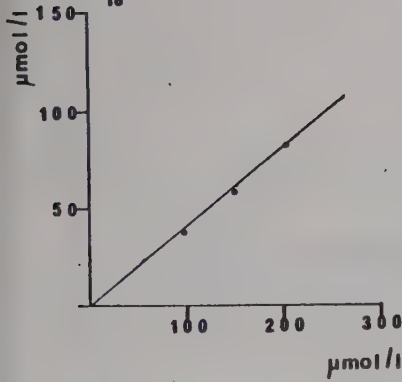
C_{16}



$C_{18:1}$



C_{18}



$C_{18:2}$

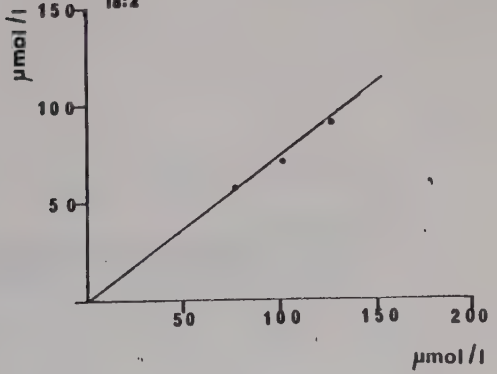


Abb. 6, 11.

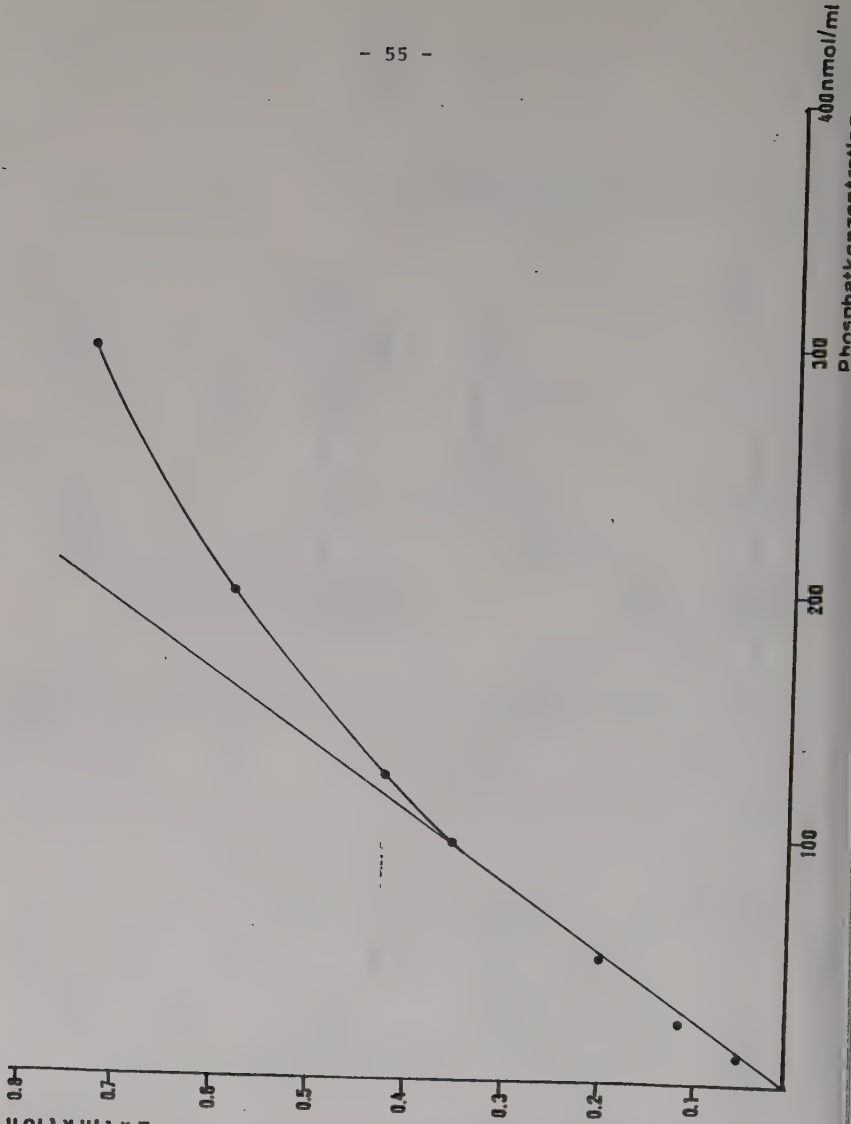


Abb. 7: Eichkurve der Phosphatbestimmung nach Fuske und Subbarow bei der photometrischen Bestimmung.

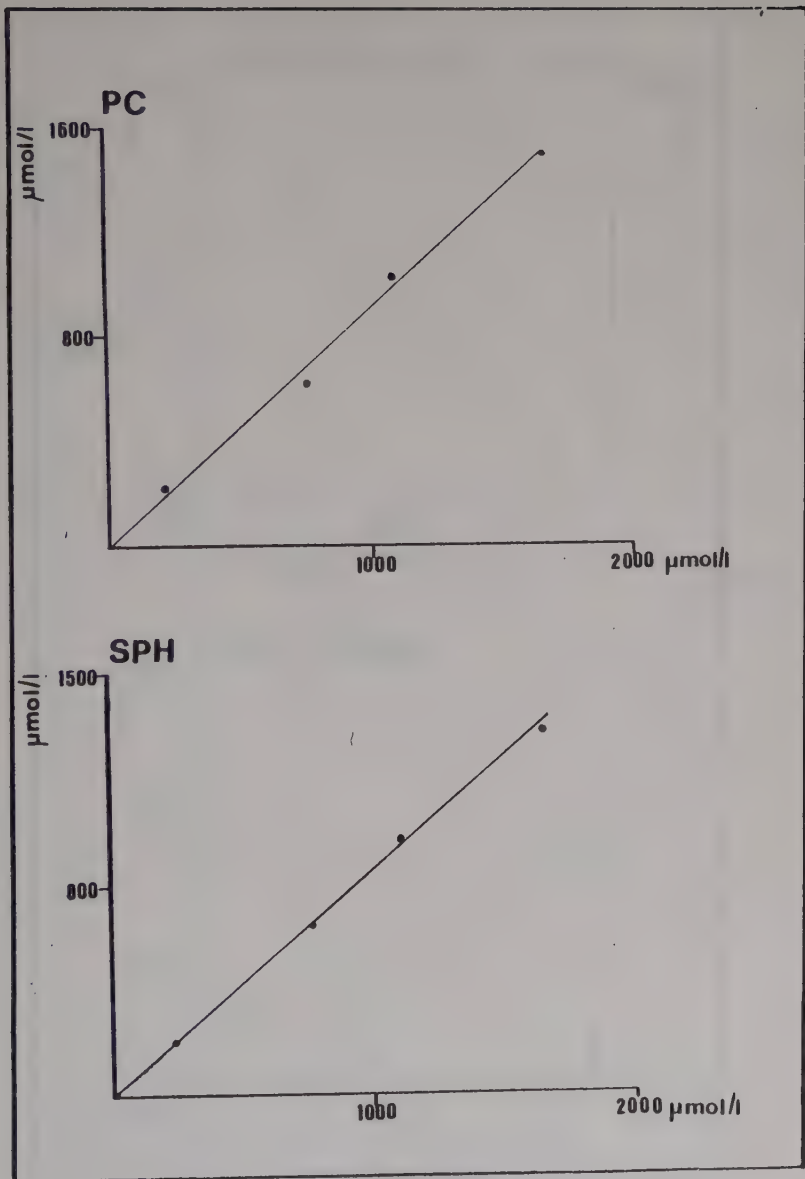


Abb. 8 I., II.: Eichkurve des Phosphatidylcholins (PC), des Sphingomyelins (SPH), des Lyso-phosphatidylcholins (LPC) und des Phosphatidyläthanolamins (PE). Authentische gegen gemessene Konzentrationen aufgetragen.

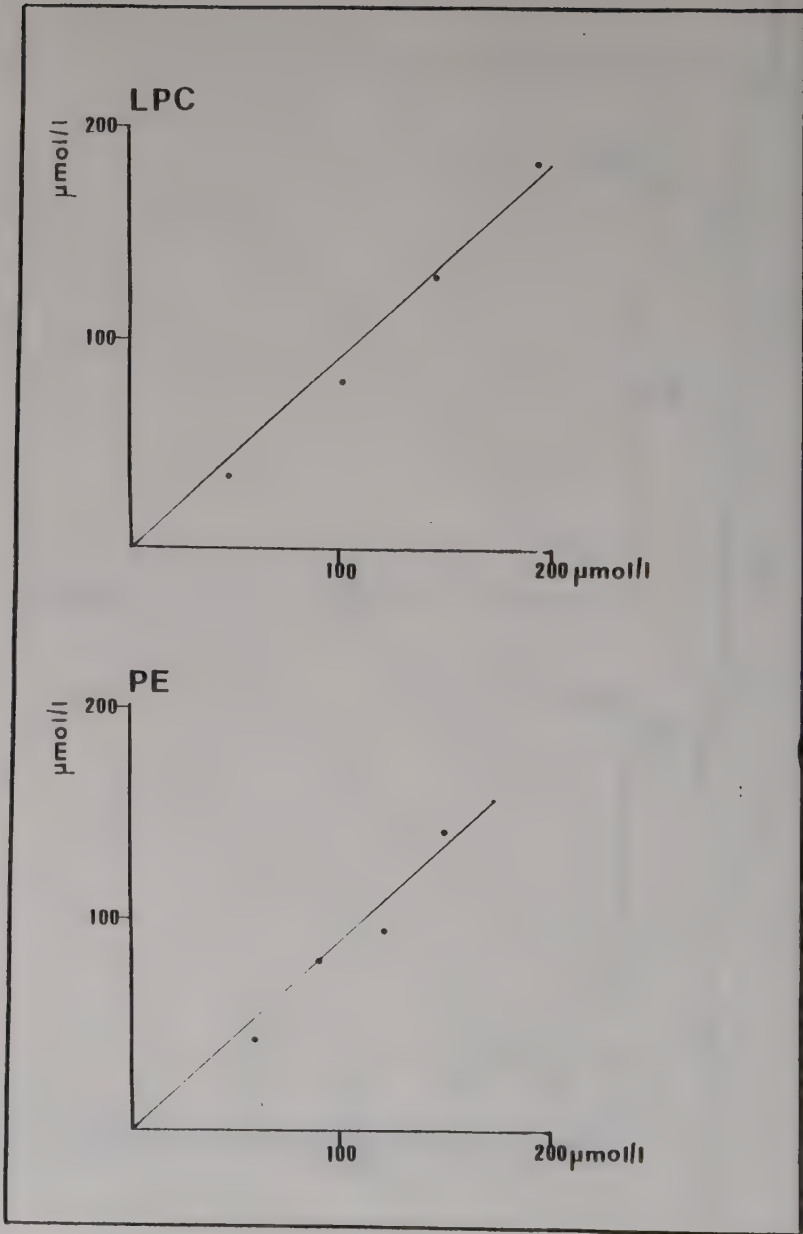


Abb. 8 II.

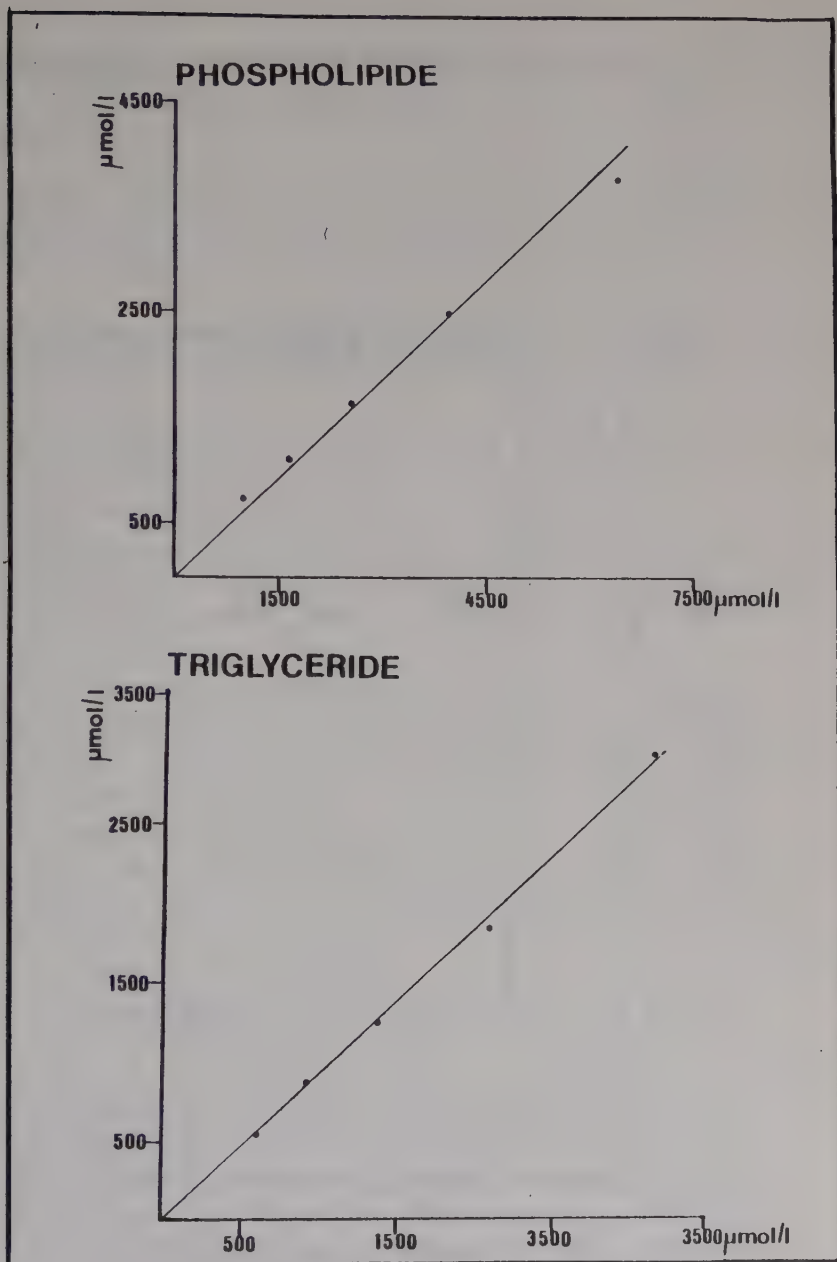


Abb. 9 I., II.: Eichkurve der Phospholipide, der Triglyceride und des Cholesterins. Es sind die authentischen gegen die gemessenen Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen.

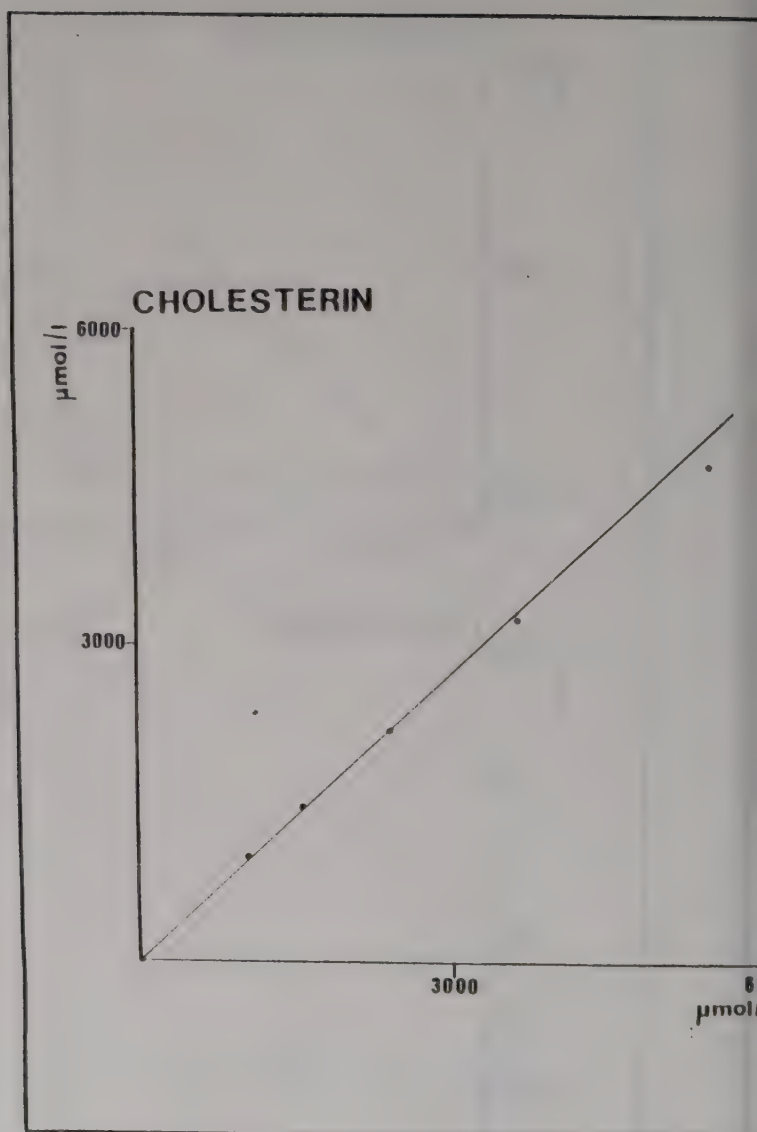


Abb. 9 II.

III ERGEBNISSE

1 Versuch A

Einfluß von Chlorthalidon, Hydrochlorothiazid und Furosemid auf die freien Fettsäuren, die Lipoproteine und die Lipoproteinfraktionen im Plasma gesunder Probanden.

1.1 Konzentrationsänderung der freien Fettsäuren im Plasma unter Diuretika-Behandlung

Die freien Fettsäuren im Plasma wurden nur bei 8 der 12 Probanden bestimmt.

Unter täglicher Einnahme von Chlorthalidon (100mg/d), Hydrochlorothiazid (100mg/d) oder Furosemid (80mg/d) waren die Konzentrationen der freien Fettsäuren im Nüchternplasma um 8.00 Uhr morgens höher als unter der Einnahme von Placebo (Abb. 10).

In Tabelle 18 sind die Konzentrationen der 4 Fettsäuren aufgeführt, die gaschromatographisch erfaßt werden können. Dabei handelt es sich um die gesättigten Fettsäuren Palmitin- und Stearinsäure und um die ungesättigten Fettsäuren Öl- und Linolsäure. Unter der Behandlung mit jedem der Diuretika waren alle 4 Fettsäuren höher als in der Placebo-Periode. Die Differenzen zwischen den Mittelwerten der Placebo-Periode und den 3 Behandlungsperioden sind nicht in allen Fällen statistisch signifikant.

Die Konzentration der Palmitinsäure war in allen 3 Behandlungsperioden signifikant höher als in der Placeboperiode. Eine Erhöhung der Ölsäure war in allen 3 Behandlungsperioden festzustellen, aber die Irrtumswahrscheinlichkeit für diese Erhöhung war nur für 2 Behandlungsperioden $< 5\%$. Auch die Linol- und Stearinsäure waren in allen 3 Behandlungsperioden höher als in der Placebophase, aber die Irrtumswahrscheinlichkeit der Differenzen war nicht kleiner als 5% .

Die durchschnittliche Erhöhung betrug unter Chlorthalidon 26%, unter Hydrochlorothiazid 37% und unter Furosemid 29%. Die Erhöhung war in keiner der 4 Fettsäuren besonders ausgeprägt, sondern in allen etwa gleich stark, allerdings mit erheblichen Streuungen belastet.

1.2 Veränderungen der Konzentrationen der Lipoproteine im Plasma unter Diuretika-Behandlung

Signifikant höhere Werte als unter Placebo-Behandlung fanden sich - wie Abbildung 10 und Tabelle 19 zeigen - unter Behandlung mit den Diuretika bei den Triglyceriden und dem Cholesterin im Plasma, während die Phospholipide unter den Diuretika nicht höher lagen als unter Placebo.

Die mittlere Konzentration der Triglyceride betrug unter Placebo-Behandlung 897 ± 250 $\mu\text{mol/l}$, unter Chlorthalidon 1111 ± 329 $\mu\text{mol/l}$, unter Hydrochlorothiazid 1116 ± 305 $\mu\text{mol/l}$ und unter Furosemid 1226 ± 429 $\mu\text{mol/l}$. Der Konzentrationsunterschied von 24% zwischen Placebo und Chlorthalidon oder Hydrochlorothiazid und der von 37% zwischen Placebo und Furosemid war mit 99% Wahrscheinlichkeit nicht durch Zufall bedingt ($p < 0,01$) (Tab. 19).

Unter Placebo betrug die mittlere Konzentration des Cholesterins 4268 ± 658 $\mu\text{mol/l}$. Unter Chlorthalidon lag das Cholesterin um 341 $\mu\text{mol/l}$ (8%), unter Hydrochlorothiazid um 380 $\mu\text{mol/l}$ (9%) und unter Furosemid um 251 $\mu\text{mol/l}$ (6%) höher. Diese Konzentrationsunterschiede zwischen der Placeboperiode und unter den 3 Diuretikaperioden sind mit 95% Wahrscheinlichkeit als statistisch signifikant ($p < 0,05$) und damit als real zu betrachten (Tab. 19).

Der Konzentrationsunterschied der Phospholipide im Plasma zwischen der Placeboperiode und den 3 Behandlungsperioden mit Diuretika liegt zwischen 1% und 4% und ist damit als geringfügig anzusehen, obwohl die Differenz beim Chlorthalidon mit einem $p < 0,05$ als signifikant angesehen werden könnte.

1.3 Konzentrationsänderungen der Lipoproteinfractionen im Plasma unter Behandlung mit Diuretika

Aus den Daten in Tabelle 20 ist zu entnehmen, daß unter der Behandlung mit den 3 Diuretika ca. 35 - 52% mehr VLDL im Plasma vorhanden war als unter Placebo. Die Vermehrung betraf die 3 Lipidbestandteile in etwa gleichem Umfang, daher ist anzunehmen, daß die Zusammensetzung der Partikel gleich geblieben war. Unter Furosemid war die Erhöhung etwas stärker ausgeprägt als unter den beiden anderen Diuretika (Abb. 11, I.).

Die LDL waren unter der Diuretika-Behandlung um 5 - 10% höher als in der Placeboperiode (Abb. 11, II.).

Die HDL zeigten unter Diuretika-Einnahme keine Veränderungen (Abb. 11, III.).

In Tabelle 21 sind die Konzentrationen von 4 Phospholipiden in den 3 Lipoproteinfractionen wiedergegeben. Daraus ist zu erkennen, daß auch hier unter der Behandlung mit den Diuretika eine Erhöhung der VLDL festzustellen war, die alle 4 Phospholipide gleichmäßig betraf. In den beiden anderen Fraktionen, den LDL und den HDL war unter der diuretischen Therapie keine Veränderung signifikanten Ausmaßes eingetreten.

1.4 Veränderungen anderer Parameter unter der Behandlung mit Diuretika

Aus Tabelle 22 geht hervor, daß die Probanden unter den Diuretika 1,0 - 1,5kg Körpergewicht abgenommen hatten.

Wie aus Tabelle 23 zu entnehmen ist, war gleichzeitig mit der Gewichtsabnahme die Natrium-Konzentration im Plasma etwas angestiegen, das Kalium deutlich abgefallen und die Harnsäure signifikant erhöht. Dies sind bekannte Effekte der Diuretika-Behandlung, die bei jedem einzelnen Probanden vorhanden waren.

Tabelle 24 zeigt, daß die Konzentration der Plasmaproteine geringfügig, die des Plasma-Kreatinins wesentlich stärker

und mit einem p-Wert $< 0,05$ statistisch signifikant angestiegen waren. Auch der etwas höhere Hämatokrit unter der diuretischen Therapie als unter Placebo weist auf eine geringfügige Hämokonzentrierung hin. Der Blutdruck hatte sich jedoch unter der diuretischen Behandlung nicht verändert. Der systolische Blutdruck war unter den Diuretika geringfügig um 2 - 3 mmHg niedriger als in der Placeboperiode, während der diastolische Blutdruck völlig gleich geblieben war.

2 Versuch B

Durch diesen Versuch sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- a.) An welchem Tag tritt der Konzentrationsanstieg der freien Fettsäuren, der Lipoproteine und der Lipoproteinfraktionen im Plasma gesunder Probanden nach Hydrochlorothiazid-Gabe von 50, 100 und 150mg täglich auf?
- b.) Ist der Lipidanstieg durch Diuretika von der Dosis abhängig?

Zu a.):

Abbildung 12 stellt den Kurvenverlauf der freien Fettsäuren während der 9 Versuchstage bei allen 3 Hydrochlorothiazid-Dosen dar. Die freien Fettsäuren steigen bereits am ersten Tag nach der Diuretikumeinnahme an und erreichen überwiegend am 3. bzw. 4. Versuchstag ihr Maximum.

Bei der 150mg-Dosis liegt das Maximum aller 4 Fettsäuren am 3. Versuchstag. Unter 100mg Hydrochlorothiazid ist jedoch der Zeitpunkt des Maximums der Fettsäuren nicht einheitlich. Palmitin- und Linolsäure erreichen ihr Maximum am 3. Versuchstag, während Stearin- am 2. und 3. und Ölsäure am 3. und 4. Versuchstag annähernd gleich hohe Werte zeigen. Unter 50mg Hydrochlorothiazid liegt das Maximum der Palmitin- und Ölsäure am 4., das der Stearinsäure am 2. und das der Linolsäure am 3. Versuchstag.

Unter 150mg Hydrochlorothiazid ist der Anstieg der freien Fettsäuren abhängig von ihrer Anfangskonzentration. Am Tag des Maximums weisen die Fettsäuren mit der höchsten Plasmakonzentration, d.h. die Palmitin- und Ölsäure, einen Anstieg von 74 - 104% auf, während die Linolsäure am Tag ihres Maximums um 63% und die Stearinsäure um 37% erhöht war.

Bei der 150mg-Dosis liegen die Werte der freien Fettsäuren, trotz des Abfalls, während der 5-tägigen Diuretikumbehandlung über dem Ausgangswert. Dies gilt auch für die 100mg-Dosis mit Ausnahme der Stearinsäure, bei welcher der Ausgangswert am letzten Medikamenttag wieder erreicht wird. Bei der 50mg-Dosis ist der Kurvenverlauf der freien Fettsäuren uneinheitlich. Die Konzentration der Palmitin- und Stearinsäure schwankt an den letzten Medikamenttagen um den Ausgangswert, während die der Linolsäure etwas über und die der Ölsäure am 5. und 6. Versuchstag bereits unter dem Ausgangswert liegt.

Nach Absetzen des Diuretikums fallen die freien Fettsäuren weiter ab und erst am letzten Tag der Abklingsphase steigen sie wieder schwach an mit Ausnahme der Palmitinsäure bei der 100mg-Dosis. Bei der 150mg-Dosis erfolgt dieser Anstieg bereits am vorletzten Tag der Abklingsphase. Nur bei der 150mg-Dosis liegen alle Fettsäurenwerte nach Absetzen des Diuretikums über dem Ausgangswert. Bei der 100 und 50mg-Dosis liegen sie z.T. weit darunter.

Einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die freien Fettsäuren zeigen auch die Lipoproteine und Lipoproteinfraktionen im Plasma. Abbildung 13 stellt ihren Kurvenverlauf über die 9 Versuchstage dar.

Bei der 150mg-Dosis beginnt der Anstieg der Gesamttriglyceride und des Gesamtcholesterins verglichen mit dem der freien Fettsäuren erst später und ist auch schwächer ausgeprägt (Abb. 13, I.). Nach dem Erreichen eines Maximums folgt der bereits bei den freien Fettsäuren beobachtete Abfall, der bis zum vorletzten Tag der Abklingsphase fort-dauert. Die Konzentrationen der Lipoproteine bleiben wäh-

rend der Medikamenteinnahme über dem Ausgangswert. Erst nach Absetzen des Diuretikums erreichen sie niedrigere Werte. Wie Abbildung 13, I. zeigt, wiesen die VLDL und LDL einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die Gesamttriglyceride und das Gesamtcholesterin auf. Wegen eines technischen Defektes der Ultrazentrifuge ist die Fraktionierung der Plasmalipoproteine z.T. mißlungen, so daß am 1., 2. und 3. Versuchstag für die Bildung der Mittelwerte nur die Werte von 4 der 8 Probanden herangezogen werden konnten.

Bei der 100mg-Dosis setzt der Anstieg der Gesamt- und VLDL-Triglyceride und des Gesamt- und LDL-Cholesterins, ähnlich wie bei den freien Fettsäuren, gleich nach der Diuretikum-Einnahme ein. Der prozentuale Anstieg der Gesamt- und VLDL-Triglyceride entspricht dem der freien Fettsäuren, während der des Gesamt- und LDL-Cholesterins geringer ist. Ein Maximum wird früher als bei der 150mg-Dosis erreicht. Danach fällt die Plasmakonzentration ab, bleibt jedoch unter Diuretikum über dem Ausgangswert (VLDL-Triglyceride). Erst nach Absetzen des Diuretikums sinkt die Konzentration unter den Ausgangswert ab. Am letzten Versuchstag steigt sie wieder schwach an.

Bei der 50mg-Dosis verlaufen die Kurven der Gesamt- und VLDL-Triglyceride so flach, daß kein eindeutiges Verhalten zu erkennen ist. Gesamt-Cholesterin und LDL-Cholesterin zeigen, ähnlich wie bei der 100mg-Dosis, einen sofortigen Anstieg nach der Diuretikumeinnahme, der bei dem LDL-Cholesterin am 4. und bei dem Gesamt-Cholesterin am 2. Versuchstag ein Maximum erreicht. Darauf folgt ein Abfall bis zum vorletzten Tag des Versuchs. Dabei fällt die Konzentration des Gesamt-Cholesterins bereits am 5. Versuchstag trotz Diuretikumbehandlung unter den Ausgangswert ab, während die des LDL-Cholesterins am 5. Versuchstag den Ausgangswert fast erreicht.

Zu b.):

Abbildung 14 und 15 stellen mit 3 verschiedenen Dosen erzielten Wirkungen auf die freien Fettsäuren, die Triglyceride und das Cholesterin im Plasma dar.

Der Anstieg der Palmitin- und Ölsäure war von der Diuretikum-Dosis abhängig. Bei der Stearin- und Linolsäure, den Triglyceriden und dem Cholesterin läßt sich keine Abhängigkeit von der Diuretikum-Dosis im Bereich von 50 bis 150mg erkennen. Die Dosis-Wirkungskurven enthalten nur die Werte der Probanden, die an den Versuchen mit allen drei Dosierungen teilgenommen haben (B.R., G.A., H.E., H.I.). Auf diese Weise konnten individuelle Unterschiede weitgehend vermieden werden.

3 Versuch C

Einfluß von Hydrochlorothiazid auf die freien Fettsäuren, die Lipoproteine und die Lipoproteinfraktionen im Plasma von Patienten mit Hyperlipoproteinämie vom Typ II_b und IV.

3.1 Veränderungen der Konzentrationen der freien Fettsäuren im Plasma unter Diuretika-Behandlung

Mit einer Tagesdosis von 100mg Hydrochlorothiazid über 4 Wochen fand sich bei 6 Kranken mit Hyperlipoproteinämie eine höhere mittlere Konzentration der freien Fettsäuren im Nüchternplasma um 8.00 Uhr morgens als in der Placebo-periode.

In Tabelle 28 D. sind die Konzentrationen der gesättigten Fettsäuren Palmitin- und Stearinsäure und der ungesättigten Fettsäuren Öl- und Linolsäure wiedergegeben. Daraus ist zu erkennen, daß die mittlere Erhöhung der 4 Fettsäuren unter Diuretika-Behandlung etwa gleich stark war. Die prozentuale Zusammensetzung der freien Fettsäuren bei den Patienten mit Hyperlipoproteinämie war mit der bei den Gesunden identisch. Bei den Kranken mit Hyperlipoproteinämie lagen jedoch die Placebo-Werte im Mittel um 15% höher als bei den Gesunden.

Wie aus Tabelle 28 D zu ersehen, führte Hydrochlorothiazid bei den Kranken zu einer mittleren Erhöhung der Plasmakonzentration der freien Fettsäuren von 29%. Im Vergleich zu den Gesunden ist der prozentuale wie auch absolute Anstieg der freien Fettsäuren bei den Kranken mit Hyperlipoproteinämie geringer (Tab. 34).¹

3.2. Konzentrationsänderungen der Lipoproteine im Plasma unter Diuretika-Behandlung

Unter diuretischer Therapie wurde auch bei den Kranken mit Hyperlipoproteinämie ein Anstieg der Gesamt-Triglyceride und des Gesamt-Cholesterins festgestellt.

Wie Tabelle 28 zeigt, stiegen die Triglyceride im Plasma unter täglicher Einnahme von 100mg Hydrochlorothiazid von 2810 ± 1013 $\mu\text{mol/l}$ im Mittel um 18% an. Die mittlere Konzentration des Cholesterins im Plasma betrug in der Placeboperiode 6960 ± 2034 $\mu\text{mol/l}$. Unter Hydrochlorothiazid stieg sie um 298 $\mu\text{mol/l}$. Bei den Gesamt-Phospholipiden konnte keine einheitliche Veränderung bei allen 6 Patienten festgestellt werden. 3 Patienten zeigten einen Anstieg und 3 Patienten einen Abfall des Phospholipidgehaltes im Plasma.

Im Vergleich mit dem prozentualen Anstieg der Plasmatriglyceride und des Plasmacholesterins bei den Gesunden ist der Anstieg von 18% und 4% unter Hydrochlorothiazid bei den Patienten mit Hyperlipoproteinämie geringer. Der absolute Anstieg von 524 $\mu\text{mol/l}$ der Plasmatriglyceride bei den Patienten übertrifft jedoch den der Gesunden (219 $\mu\text{mol/l}$) (Tab. 32).

3.3 Konzentrationsänderungen der Lipoproteinfraktionen im Plasma unter Diuretika-Behandlung

Aus den Daten in Tabelle 28 geht hervor, daß unter diuretischer Behandlung die VLDL-Fraktion bei den Hyperlipoproteinämikern zunahm. Der Anstieg der VLDL-Fraktion von ca. 20% bei den Patienten mit Hyperlipoproteinämie war

jedoch unter Hydrochlorothiazid schwächer ausgeprägt als bei den Gesunden (35 - 40%) (Tab. 34). Die Erhöhung war in keinem der 3 Lipidbestandteile der VLDL besonders ausgeprägt, sondern in allen etwa gleich stark. Daher ist anzunehmen, daß auch bei den Hyperlipoproteinämikern die ganze VLDL-Fraktion unter Diuretika zunimmt.

Wie Tabelle 28 zeigt, nahm in der LDL-Fraktion bei den 6 Patienten mit Hyperlipoproteinämie die mittlere Konzentration des Cholesterins von 4213 ± 1530 $\mu\text{mol/l}$ um 10% zu. Die LDL-Triglyceride stiegen von 547 ± 170 $\mu\text{mol/l}$ um 38% auf 757 ± 316 $\mu\text{mol/l}$, während die LDL-Phospholipide sich von 1232 ± 375 $\mu\text{mol/l}$ um 7% erhöhten. Die 3 Lipidbestandteile der LDL nahmen also unter Diuretika-Behandlung nicht in gleichem Umfang zu. In Tabelle 29 sind die 6 Patienten nach dem Typ der Hyperlipoproteinämie in 2 Untergruppen aufgeteilt worden. Wie aus der Tabelle 29 hervorgeht, steigen die 3 Lipidbestandteile der LDL bei den 3 Patienten mit Hyperlipoproteinämie vom Typ II_b etwa gleich stark an, d.h. um 12 bis 16%. Daher ist anzunehmen, daß unter diuretischer Therapie die ganze LDL-Fraktion bei den Patienten mit Hyperlipoproteinämie vom Typ II_b zunimmt. Bei den Patienten mit Hyperlipoproteinämie vom Typ IV fand sich jedoch nur für die LDL-Triglyceride eine deutliche Erhöhung von 63% unter Diuretika-Behandlung.

In Tabelle 28 sind die Konzentrationen der HDL unter Diuretikum bzw. Placebo aufgeführt. Die geringfügigen Konzentrationsänderungen der HDL lagen innerhalb des Fehlerbereichs der Bestimmungsmethoden, so daß für die HDL-Fraktion unter Diuretika weder eine Zu- noch Abnahme zu erkennen war.

3.4 Veränderungen anderer Parameter unter der Behandlung mit Diuretika

Unter der täglichen Einnahme von 100mg Hydrochlorothiazid über 4 Wochen nahmen die Patienten mit Hypolipoproteinämie 1,7 kg Körpergewicht ab (Tab. 30).

Die bereits bekannten Effekte der Diuretika-Therapie traten auch bei den Hyperlipoproteinämikern auf, d.h. das Kalium im Plasma war deutlich abgefallen, während die Harnsäure

zugenommen hatte. Die Natrium-Konzentration hatte sich unter Diuretika-Behandlung nicht verändert. Der Hämatokrit war schwach erhöht, was auf eine geringfügige Hämokonzentrierung hinweist. Die Konzentration des Kreatinins im Plasma war unter Diuretika um $12,1 \mu\text{mol/l}$ höher als in der Placeboperiode (Tab. 30).

4 Versuch D

Einfluß der Hydrochlorothiazid-Dosierung auf die freien Fettsäuren, die Lipoproteine und die Lipoproteinfraktionen von 2 Patienten mit Hyperlipoproteinämie vom Typ IV.

Die Abbildung 16 stellt den Kurvenverlauf der Gesamt-Lipide von zwei Fettstoffwechselkranken mit Hyperlipoproteinämie vom Typ IV über einen Zeitraum von 2 - 3 Monaten dar. Die Lipidwerte unterlagen - sowohl während der Hydrochlorothiazidverabreichung im Bereich von 50 bis 150mg als auch während der behandlungsfreien Tage - hohen Schwankungen. Eine eindeutige Lipidveränderung ist daher während der jeweiligen Hydrochlorothiazid-Periode nicht zu erkennen.

Durch Ermittlung des Mittelwertes für die Hydrochlorothiazid-Periode einerseits und für die behandlungsfreien Tage¹⁾ andererseits wurde nur für Patient I für die VLDL-Triglyceride und freien Fettsäuren eine Erhöhung unter allen 3 Diuretikum-Dosen festgestellt.

VLDL-Triglyceride

50mg/T Hydrochlor.:	von	1350 ± 350	auf	1770 ± 510	$\mu\text{mol/l}$
100mg/T	"	:	"	1470 ± 250	" 1880 ± 537
150mg/T	"	:	"	1190 ± 230	" 1333 ± 416

Palmitinsäure (C₁₆)

50mg/T Hydrochlor.:	von	272 ± 54	auf	285 ± 68	$\mu\text{mol/l}$
100mg/T	"	:	"	253 ± 54	" 281 ± 56
150mg/T	"	:	"	206 ± 41	" 264 ± 51

1) Der erste Tag nach Absetzen des Medikaments ist nicht miteinbezogen.

Stearinsäure (C₁₈)

50mg/T Hydrochlor.:	von	82 $\pm$ 3,46	auf	97,4 $\pm$ 12,58	/ μ mol/l
100mg/T	"	:	"	99 $\pm$ 24,50	" 112,5 $\pm$ 24,57/ μ mol/l
150mg/T	"	:	"	71 $\pm$ 6,93	" 96,7 $\pm$ 13,68/ μ mol/l

Ölsäure (C_{18:1})

50mg/T Hydrochlor.:	von	255 $\pm$ 20,66	auf	267,6 $\pm$ 87,78	/ μ mol/l
100mg/T	"	:	"	213 $\pm$ 33,60	" 262,4 $\pm$ 72,77/ μ mol/l
150mg/T	"	:	"	215 $\pm$ 71,14	" 285,9 $\pm$ 36,79/ μ mol/l

Linolsäure (C_{18:2})

50mg/T Hydrochlor.:	von	121 $\pm$ 10,44	auf	141,0 $\pm$ 29,13	/ μ mol/l
100mg/T	"	:	"	128 $\pm$ 14,80	" 130,0 $\pm$ 22,28/ μ mol/l
150mg/T	"	:	"	114 $\pm$ 12,66	" 136,3 $\pm$ 22,24/ μ mol/l

5 Versuch E

Einfluß des Zigarettenrauchens auf die Lipidwerte.

Tabelle 32 enthält die Mittelwerte der Lipidkonzentrationen von 10 Rauchern vor und nach dem Rauchen von 2 Zigaretten. Nach dem t-Test für gepaarte Meßwerte wurden keine signifikanten Konzentrationsänderungen festgestellt.

Tabelle 18: Mittlere Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) im Nüchternplasma um 8.00 Uhr morgens und Standardabweichung der Palmitin-(C_{16}), Stearin-(C_{18}), Ölsäure-($\text{C}_{18:1}$) und Linolsäure ($\text{C}_{18:2}$) bei 8 Probanden unter Behandlung mit Placebo, Chlorthalidon, Hydrochlorothiazid und Furosemid. In Klammern ist die Differenz zur Placeboperiode angegeben. t-Test für gepaarte Meßwerte: $p < 0,02$

F.F.S.	Placebo	Chlorthalidon	Hydrochloroth.	Furosemid
C_{16}	172 $\pm$ 50	207 $\pm$ 50 (35) ^a	253 $\pm$ 63 (81) ^a	208 $\pm$ 56 (36) ^a
C_{18}	57 $\pm$ 32	67 $\pm$ 39 (10)	64 $\pm$ 20 (7)	73 $\pm$ 23 (16)
$\text{C}_{18:1}$	153 $\pm$ 69	189 $\pm$ 90 (36)	198 $\pm$ 67 (45) ^a	206 $\pm$ 57 (53) ^a
$\text{C}_{18:2}$	86 $\pm$ 35	116 $\pm$ 47 (30)	138 $\pm$ 49 (52)	109 $\pm$ 55 (23)

Tabelle 19: Triglyceride (TG), Cholesterin (CHOL) und Phospholipide (PHOS) im Nüchternplasma bei 12 gesunden Probanden unter Einnahme von Chlorthalidon, Hydrochlorothiazid, Furosemid und Placebo über jeweils drei Wochen. Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$. In Klammern ist die Differenz zur Placeboperiode angegeben.
t-Test für gepaarte Meßwerte: $p < 0,05^+$; $p < 0,01^{++}$.

Gesamtlipide	Placebo	Chlorthalidon	Hydrochloroth.	Furosemid
TG	897 $\pm$ 230	1111 $\pm$ 329 ⁺⁺ (214)	1116 $\pm$ 305 ⁺⁺ (219)	1226 $\pm$ 429 ⁺⁺ (329)
CHOL	4268 $\pm$ 658	4609 $\pm$ 629 ⁺ (341)	4648 $\pm$ 677 ⁺ (380)	4519 $\pm$ 696 ⁺ (251)
PHOS	2525 $\pm$ 229	2621 $\pm$ 268 ⁺ (96)	2579 $\pm$ 275 (54)	2556 $\pm$ 220 (31)

Tabelle 20, I - III: Mittlere Konzentration und Standardabweichung ($\mu\text{mol/l}$) der Triglyceride (TG), des Cholesterins (CHOL) und der Phospholipide (PHOS) in der VLDL-, LDL- und HDL-Fraktion im Nüchternplasma bei 12 Probanden während dreiwöchiger Verabreichung von Chlorthalidon, Hydrochlorothiazid, Furosenid und Placebo. In Klammern ist die Differenz zur Placeboperiode angegeben. t-Test für gepaarte Messwerte: $p < 0,05$; $p < 0,02$; $p < 0,001$; $p < 0,0001$; $p < 0,00001$.

I. VLDL-Fraktion	Placebo	Chlorthalidon	Hydrochlorothiazid	Furosenid
TG	468 $\pm$ 192	643 $\pm$ 250 ⁺⁺⁺ (175)	654 $\pm$ 205 ⁺⁺⁺⁺ (186)	735 $\pm$ 397 ⁺ (267)
CHOL	224 $\pm$ 123	306 $\pm$ 171 ⁺⁺⁺ (82)	308 $\pm$ 147 ⁺⁺⁺⁺ (84)	346 $\pm$ 234 ⁺ (122)
PHOS	150 $\pm$ 64	195 $\pm$ 89 ⁺⁺ (45)	205 $\pm$ 102 ⁺⁺⁺ (55)	217 $\pm$ 110 ⁺⁺ (67)
II. LDL-Fraktion	Placebo	Chlorthalidon	Hydrochlorothiazid	Furosenid
TG	290 $\pm$ 64	310 $\pm$ 57 (20)	286 $\pm$ 58 (-4)	316 $\pm$ 89 (26)
CHOL	2633 $\pm$ 620	2910 $\pm$ 578 ⁺ (277)	2915 $\pm$ 743 ⁺ (282)	2749 $\pm$ 570 (116)
PHOS	851 $\pm$ 124	916 $\pm$ 182 (65)	905 $\pm$ 171 (54)	899 $\pm$ 189 (48)
III. HDL-Fraktion	Placebo	Chlorthalidon	Hydrochlorothiazid	Furosenid
TG	140 $\pm$ 32	145 $\pm$ 25 (5)	147 $\pm$ 25 (7)	149 $\pm$ 45 (9)
CHOL	1328 $\pm$ 231	1314 $\pm$ 178 (-14)	1337 $\pm$ 206 (9)	1295 $\pm$ 196 (-33)
PHOS	1081 $\pm$ 148	1025 $\pm$ 106 (-56)	1069 $\pm$ 143 (-12)	1089 $\pm$ 150 (8)

Tabelle 21, I - IV: Plasmaspiegel des Phosphatidylcholins (PC), Sphingomyelins (Sph), Lyso-phosphatidylcholins (LPC) und Phosphatidyläthanolamins (PE) im Nüchtern-plasma und in den Lipoproteinfractionen bei 12 männlichen Probanden unter der Gabe von Chlorthalidon, Hydrochlorothiazid, Furosemid und Placebo jeweils über drei Wochen. Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$. In Klammern ist die Differenz zur Placeboperiode angegeben. t-Test für gepaarte Meßwerte: $p < 0,01^+$; $p < 0,05^{++}$.

Diuretikum	Placebo	Chlorthalidon	Hydrochlorothiazid	Furosemid
<u>I. Gesamtplasma</u>				
PC	1709 $\pm$ 174	1786 $\pm$ 238 (77)	1718 $\pm$ 211 (9)	1782 $\pm$ 229 (73)
Sph	491 $\pm$ 53	506 $\pm$ 72 (15)	510 $\pm$ 75 (19)	515 $\pm$ 58 (24)
LPC	222 $\pm$ 33	223 $\pm$ 41 (1)	228 $\pm$ 15 (6)	239 $\pm$ 22 (17)
PE	116 $\pm$ 32	131 $\pm$ 24 (15)	133 $\pm$ 36 (17)	127 $\pm$ 37 (11)
<u>II. Very Low Density Lipoprotein</u>				
PC	111 $\pm$ 45	146 $\pm$ 67 ⁺ (35)	151 $\pm$ 71 ⁺ (40)	168 $\pm$ 84 ⁺ (57)
Sph	24 $\pm$ 11	28 $\pm$ 15 (4)	31 $\pm$ 18 ⁺⁺ (7)	33 $\pm$ 16 ⁺⁺ (9)
LPC	7 $\pm$ 3	9 $\pm$ 4 (2)	8 $\pm$ 5 (1)	9 $\pm$ 6 (2)
PE	12 $\pm$ 8	14 $\pm$ 7 (2)	14 $\pm$ 7 (2)	15 $\pm$ 7 (3)

Tab. 21:

III. Low-Density-Lipoprotein

PC	544 $\pm$ 102	580 $\pm$ 129 (36)	365 $\pm$ 119 (-179)	570 $\pm$ 29 (26)
Sph	262 $\pm$ 38	277 $\pm$ 42 (15)	271 $\pm$ 48 (9)	262 $\pm$ 53 (0)
LPC	27 $\pm$ 3	27 $\pm$ 8 (0)	28 $\pm$ 5 (1)	29 $\pm$ 7 (2)
PE	34 $\pm$ 13	40 $\pm$ 19 (6)	34 $\pm$ 10 (0)	32 $\pm$ 9 (-2)

IV. High-Density-Lipoprotein

PC	811 $\pm$ 126	783 $\pm$ 84 (-28)	800 $\pm$ 96 (-11)	823 $\pm$ 121 (12)
Sph	178 $\pm$ 21	165 $\pm$ 21 (-13)	163 $\pm$ 29 (-15)	170 $\pm$ 24 (-8)
LPC	32 $\pm$ 8	33 $\pm$ 5 (1)	36 $\pm$ 10 (4)	34 $\pm$ 5 (2)
PE	56 $\pm$ 12	56 $\pm$ 27 (0)	63 $\pm$ 17 (7)	64 $\pm$ 20 (8)

Tabelle 22: Mittleres Gewicht und Standardabweichung in kg bei 12 Probanden unter Einnahme von Chlorthalidon, Hydrochlorothiazid, Furosemid und Placebo jeweils über 3 Wochen. In Klammern ist die Differenz zur Placeboperiode angegeben. t-Test für gepaarte Meßwerte: $p < 0,01^+$; $p < 0,005^{++}$.

<u>Diuretikum</u>	<u>Gewicht</u>
Placebo	74,47 $\pm 6,27$
Chlorthalidon	72,09 $\pm 6,09^{++}$ (-1,38)
Hydrochlorothiazid	71,94 $\pm 6,09^{++}$ (-1,53)
Furosemid	72,47 $\pm 6,32^+$ (-1,00)

Tabelle 23: Mittlere Konzentration und Standardabweichung der Harnsäure, des Kaliums (K^+) und des Natriums (Na^+) im Nüchternplasma bei 12 gesunden Probanden während dreiwöchiger Gabe von Chlorthalidon, Hydrochlorothiazid, Furosemid und Placebo. In Klammern ist die Differenz zur Placeboperiode angegeben. t-Test für gepaarte Meßwerte: $p < 0,001^+$; $p < 0,01^{++}$; $p < 0,05^{+++}$.

<u>Diuretikum</u>	<u>Harnsäure</u> ($\mu\text{mol/l}$)	<u>K^+</u> (mval/l)	<u>Na^+</u> (mval/l)
Placebo	328,3 $\pm 31,1$	4,31 $\pm 0,38$	146,7 $\pm 2,3$
Chlorthalidon	433,3 $\pm 65,3^+$ (105)	3,48 $\pm 0,37^+$ (-0,83)	147,7 $\pm 2,7$ (1)
Hydrochlorothiazid	397,6 $\pm 52,2^+$ (69,3)	3,68 $\pm 0,41^{++}$ (-0,63)	148,1 $\pm 3,0$ (1,4)
Furosemid	399,4 $\pm 47,9^+$ (71,1)	4,02 $\pm 0,32$ (0,29)	149,7 $\pm 3,2^{+++}$ (3)

Tabelle 24: Blutglucose, Plasmaprotein, Plasmakreatinin, Hämatokrit, Syst. und Diast. Blutdruck bei 12 Probanden während dreiwöchiger Verabreichung von Chlorthalidon, Hydrochlorothiazid, Furosemid und Placebo. In Klammern ist die Differenz zur Placebo-periode angegeben. t-Test für gepaarte Messwerte: $p < 0,05$.

Diuretikum	Plasmaprotein g/l	Blutglucose mmol/l	Hämatokrit %	Plasmakreat. μmol/l	Syst.R.R. mmHg	Diast.R.R. mmHg
Placebo	69,6 ± 2,3	4,10 ± 0,37	44,2 ± 2,0	82,2 ± 8,6	117,2 ± 6,3	82,5 ± 6,2
Chlorthal.	71,8 ± 3,0 (2,2)	4,20 ± 0,28 (0,1)	45,2 ± 1,8 (1)	87,8 ± 6,9 ⁺ (5,6)	115,3 ± 9,7 (-1,9)	84,1 ± 7,6 (1,6)
Hydrochlor.	70,7 ± 3,7 (1,1)	4,07 ± 0,23 (0,03)	45,1 ± 3,0 (0,9)	87,9 ± 9,2 ⁺ (5,7)	114,9 ± 7,1 (-3)	82,8 ± 6,6 (0,3)
Furosemid	70,1 ± 3,7 (0,5)	4,32 ± 0,40 (0,22)	44,6 ± 2,7 (0,4)	85,7 ± 6,3 ⁺ (3,5)	114,2 ± 5,9 (-3)	82,9 ± 5,6 (0,4)

Tabelle 25: Palmitin-(C₁₆), Stearin-(C₁₈), Ö1-(C_{18:1}) und Linolsäure (C_{18:2}) im Nüchternplasma vor und nach 5-tägiger Verabreichung von 150mg/d, 100mg/d und 50mg/d Hydrochlorothiazid. Mittlere Konzentration und Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$. Am Versuch mit der 100mg-Dosis nahmen 6 und an den beiden anderen Versuchen 8 Probanden teil. Der Klammerwert gibt die Differenz vor und nach der Einnahme an. t-Test für gepaarte Meßwerte: $p < 0,05^1$; $p < 0,025^2$; $p < 0,01^3$; $p < 0,005^4$.

F.F.S.	150mg/d Hydrochlor.		100mg/d Hydrochlor.		50mg/d Hydrochlor.	
	vor	nach	vor	nach	vor	nach
C ₁₆	174 $\pm$ 46	239 $\pm$ 72 ³⁾ (65) 378	178 $\pm$ 42	236 $\pm$ 46 ⁴⁾ (58) 32,68	195 $\pm$ 30	227 $\pm$ 47 (32) 248
C ₁₈	52 $\pm$ 16	69 $\pm$ 17 (11) 218	53 $\pm$ 15	71 $\pm$ 17 ¹⁾ (18) 348	66 $\pm$ 9	73 $\pm$ 10 (7) 108
C _{18:1}	155 $\pm$ 64	235 $\pm$ 110 ²⁾ (30) 568	192 $\pm$ 43	250 $\pm$ 55 ¹⁾ (58) 308	192 $\pm$ 42	239 $\pm$ 74 (74) 248
C _{18:2}	88 $\pm$ 19	125 $\pm$ 34 ³⁾ (37) 428	85 $\pm$ 24	120 $\pm$ 22 ³⁾ (35) 418	99 $\pm$ 20	123 $\pm$ 33 (24) 248
		368		34,58		20,58

Tabelle 26: Mittlere Konzentration und Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$ der Triglyceride (TG), des Cholesterins (CHOL) und der Phospholipide (PHOS) im Nüchternplasma vor und nach der Verabreichung von 150mg/d, 100mg/d und 50mg/d Hydrochlorothiazid jeweils über 5 Tage.

Am Versuch mit der 100mg-Dosis nahmen 6 und an den beiden anderen Versuchen 8 Probanden teil. Der Klammerwert gibt die Differenz vor und nach der Medikamenteneinnahme an. t-Test für gepaarte Meßwerte: $p < 0,01^{1)}$; $p < 0,005^{2)}$; $p < 0,001^{3)}$.

Gesamt- lipide	150mg/d Hydrochlor.		100mg/d Hydrochlor.		50mg/d Hydrochlor.	
	vor	nach	vor	nach	vor	nach
TG	1204 $\pm$ 270	1319 $\pm$ 275 (115)	1058 $\pm$ 303	1247 $\pm$ 315 ¹⁾ (89)	958 $\pm$ 215	1029 $\pm$ 266
CHOL	4674 $\pm$ 412	4944 $\pm$ 565 (270)	4262 $\pm$ 512	4863 $\pm$ 466 ³⁾ (601)	4539 $\pm$ 768	4948 $\pm$ 588
PHOS			267 $\pm$ 14	310 $\pm$ 20 ²⁾ (43)	277 $\pm$ 30	313 $\pm$ 27 ³⁾ (46)

Tabelle 27: Mittlere Konzentration und Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$ der Triglyderide (TG) und des Cholesterins (CHOL) in den VLDL-, LDL- und HDL-Fractionen vor und nach der Gabe von 150mg/d, 100mg/d und 50mg/d Hydrochlorothiazid jeweils über 5 Tage. Am Versuch mit der 100mgDosis nahmen 6 und an den beiden anderen Versuchen 8 Probanden teil. Der Klammerwert gibt die Differenz vor und nach der Medikamenteneinnahme an. t-Test für gepaarte Messwerte: $p < 0,05$ ¹⁾; $p < 0,02$ ²⁾; $p < 0,01$ ³⁾; $p < 0,005$ ⁴⁾.

Lipide	150mg/d Hydrochlor. a)		100mg/d Hydrochlor.		50mg/d Hydrochlor.	
	vor	nach	vor	nach	vor	nach
VLDL-TG	648 $\pm$ 202	728 $\pm$ 230 (80)	525 $\pm$ 194	607 $\pm$ 194 ²⁾ (82)	459 $\pm$ 166	468 $\pm$ 189 (9)
VLDL-CHOL	351 $\pm$ 191	357 $\pm$ 135 (6)	217 $\pm$ 121	319 $\pm$ 111 ³⁾ (102)	183 $\pm$ 90	194 $\pm$ 89 (11)
LDL-TG	307 $\pm$ 38	285 $\pm$ 25 (-22)	247 $\pm$ 52	312 $\pm$ 93 ¹⁾ (65)	252 $\pm$ 41	238 $\pm$ 39 (-14)
LDL-CHOL	2793 $\pm$ 522	3060 $\pm$ 402 (267)	2555 $\pm$ 403	2908 $\pm$ 507 ⁴⁾ (353)	2399 $\pm$ 430	2778 $\pm$ 400 ⁴⁾ (379)
HDL-TG			124 $\pm$ 30	152 $\pm$ 21 ⁴⁾ (28)	132 $\pm$ 31	127 $\pm$ 17 (-5)
HDL-CHOL	1183 $\pm$ 87	1143 $\pm$ 138 (-40)	1197 $\pm$ 223	1337 $\pm$ 175 ¹⁾ (240)	1256 $\pm$ 314	1431 $\pm$ 331 ⁴⁾ (175)

a) Wegen eines technischen Defektes der Ultrazentrifuge ist die Fraktionierung der Lipoproteine teilweise mißlungen. Deshalb konnte der Mittelwert der Lipide in den Lipoprotein-Fractionen bei der 150mg-Dosis nur aus vier Einzelwerten gebildet werden.

Tab. 28 A. - D.: Triglyceride (TG), Cholesterin (CHOL) und Phospholipide (PHOS) im Nüchternplasma und in den Lipoproteinfraktionen - Palmitin-(C₁₆), Stearin-(C₁₈), 31-(C_{18:1}) und Linolsäure (C_{18:2}) im Nüchternserum bei 6 Patienten mit Hyperlipoproteinämie vom Typ IV und II₅ unter Einnahme von Hydrochlorothiazid und Placebo jeweils über 4 Wochen. Mittelwert (x) und Standardabweichung (s) in $\mu\text{mol/l}$. in Klammern ist die Differenz zur Placeboperiode angegeben. Wegen der Anzahl der Probanden war eine Signifikanzprüfung der Konzentrationsänderungen nicht angebracht.

A. Triglyceride

Prob.	Gesamt-TG 1) s.S. 82		VLDL-TG 1) s.S. 82		LDL-TG		HDL-TG					
	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.				
E.R.	2810	3190	148	1670	1770	68	480	670	408	210	200	-58
K.O.	2430	2570	68	1345	1510	128	450	500	118	210	230	108
T.U.	2300	3030	328	1160	1570	358	340	730	1158	230	240	48
W.A.	4540	5640	248	2610	3350	288	810	1370	698	320	440	388
P.O.	(2970	2560	-148)	(1610	1290	-208)	680	730	78	260	210	198
S.E.	1970	2240	148	1000	1180	188	520	540	48	220	240	98

B. Cholesterin

Prob.	Gesamt-CHOL		VLDL-CHOL ¹⁾ s.S. 82		LDL-CHOL		HDL-CHOL					
	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.				
E.R.	7490	8270	108	1010	1140	138	4780	5210	98	1360	1420	48
K.O.	5260	5129	- 28	730	830	148	3420	3080	-108	890	900	18
T.U.	5290	5850	118	540	810	508	3130	3540	138	1320	1210	-88
W.A.	5800	5900	18	1700	2120	258	2480	2540	28	1120	870	-228
P.O.	10600	10980	48	(1360	860	-378)	6720	8080	208	1190	1220	38
S.E.	7320	7420	18	530	600	138	4750	5330	128	1330	1200	108
$\bar{x}$	6960	7258 (298)	48	902	1100 (198)	238	4213	4630 (417)	108	1202	1138 (-64)	58
s	+2034	+2157	+ 487	+ 602	+ 1530	+2034	+ 179	+ 209				

C. Phospholipide

Prob.	Gesamt-PHOS.		VLDL-PHOS.		LDL-PHOS.		HDL-PHOS.	
	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.
E.R.	4110	4740	158	205	1344	1400	1011	1317
K.O.	3160	3940	258	137	1020	906	844	1207
T.U.	3120	4080	318	131	990	1103	860	1329
W.A.	4470	3990	-118	321	791	723	1347	866
P.O.	5490	5020	-98	267	1827	2210	1404	941
S.E.	4320	3990	-88	119	1419	1534	1457	940
$\bar{x}$	4112	4993(881)	218	197(30)	1232	1313(81)	1154	1100(-54)-58
s	± 890	± 465	± 64	± 83	± 347	± 533	± 281	± 208

D. Freie Fettsäuren¹⁾

Prob.	C ₁₆		C ₁₈		C _{18:1}		C _{18:2}	
	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.
E.R.	234	323	308	127	206	356	96	152
K.O.	188	205	98	82	212	213	18	75
T.U.	202	288	438	115	199	357	798	91
W.A.	235	267	148	108	118	274	258	101
P.O.	(326)	249	-248	87	(107)	211	-308	(151)
S.E.	156	172	108	65	28	140	18	91
$\bar{x}$	203	251(48)	238	99 (18)	228	268 (77)368	91	117(26)368
s	± 53	± 62	± 14	± 25	± 42	± 94	± 10	± 31

¹⁾ Zur Bildung dieses Mittelwerts sind die in Klammern eingesetzten Werte des Patienten P.O. nicht herangezogen worden. An den Tagen zwischen der Placebo- und Hydrochlorothiazid-Einnahme reduzierte sich das Gewicht des Patienten P.O. um 4,5 kg (Tab. 31). Die mittlere Gewichtsabnahme des Patienten P.O. bei der Hydrochlorothiazid-Behandlung (Tab. 30) kann insofern nicht allein der Diuretikawirkung zugerechnet werden. Die festgestellte Abnahme der freien Fettsäuren und der Gesamttriglyceride im Plasma, sowie der Triglyceride und des Cholesterins in der VLDL-Fraktion ist während der Hydrochlorothiazid-Behandlung als Folge der Gewichtsreduzierung zu betrachten.

Tabelle 29: Triglyceride (TG), Cholesterin (CHOL) und Phospholipide (PHOS) in der LDL-Fraktion jeweils bei 3 Patienten mit Hyperlipoproteinämie vom Typ IV und II_B unter Einnahme von Hydrochlorothiazid und Placebo über 4 Wochen. Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) in $\mu\text{mol/l}$. In Klammern ist die Differenz zur Placeboperiode angegeben.

I. Hyperlipoproteinämie vom Typ II_B

Prob.	LDL-TG		LDL-CHOL		LDL-PHOS	
	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.
E.R.	480	670	4780	5210	1344	1400
P.O.	680	730	6720	8080	1827	2210
S.E.	520	540	4750	5330	1419	1534
$\bar{x}$	560	647 (87) 16%	5417	6207 (790) 15%	1530	1715 (185) 12%
s	+106	+ 97	+1129	+1624	+ 260	+ 434

II. Hyperlipoproteinämie vom Typ IV

Prob.	LDL-TG		LDL-CHOL		LDL-PHOS	
	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.
K.O.	450	500	3420	3080	1020	906
T.U.	340	730	3130	3540	990	1103
W.A.	810	1370	2480	2540	791	723
$\bar{x}$	533	867 (334) 63%	3010	3053 (43) 1%	934	911 (-23) -2%
s	+246	+451	+ 481	+ 501	+125	+190

Tabelle 30: Kalium, Natrium, Harnsäure, Hämatokrit und Kreatinin im Nüchternplasma und Gewicht bei 6 Patienten mit Hyperlipoproteinämie vom Typ IV und Ib unter täglicher Einnahme von 100mg Hydrochlorothiazid bzw. Placebo jeweils über 4 Wochen. Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) in $\mu\text{mol/l}$. In Klammern ist die Differenz zur Placeboperiode angegeben. Wegen der Anzahl der Probanden wurde eine Signifikanzprüfung der Konzentrationenänderungen unterlassen.

Prob.	K^+ (mval/l)		Harnsäure ($\mu\text{mol/l}$)		Gewicht (kg) ¹⁾	
	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.
E.R.	4,58	3,92	385	594	81,5	79,8
K.O.	4,43	3,76	371	473	71,6	70,3
T.U.	4,39	3,81	370	488	79,3	81,5
W.A.	4,93	4,52	332	323	105,0	101,5
P.O.	4,38	4,04	456	431	86,0	80,4
S.E.	4,37	3,85	303	432	78,0	77,8
$\bar{x}$	4,51	3,98 (-0,53)	370	457 (87)	83,6	81,9 (-1,7)
s	$\pm 0,22$	$\pm 0,28$	± 52	± 89	$\pm 11,5$	$\pm 10,4$
Prob.	Na^+ (mval/l)		Hämatokrit (%)		Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	
	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.	Placebo	Hydrochlor.
E.R.	142	139	45,2	45,7	85,6	100,2
K.O.	143	141	45,9	45,7	90,1	99,7
T.U.	140	139	42,0	46,5	88,5	106,7
W.A.	139	137	44,5	44,0	76,9	90,7
P.O.	139	138	49,0	47,9	81,2	92,4
S.E.	141	140	50,0	48,8	76,7	82,1
$\bar{x}$	140,7	139,0 (-1,7)	46,1	46,4 (0,3)	83,2	95,3 (12,1)
s	$\pm 1,6$	$\pm 1,4$	$\pm 29,6$	$\pm 17,2$	$\pm 5,8$	$\pm 8,7$

¹⁾ siehe Tabelle 31, Seite 85.

Tabelle 31 A - B: Gewicht (kg) der 6 Patienten mit Hyperlipoproteinämie am Tag jeder einzelnen Blutabnahme während der Hydrochlorothiazidbehandlung mit täglich 100mg und der Placeboeinnahme jeweils über 4 Wochen. Bei dem Patient P.O. wurde am 6.11. - Tag vor dem Beginn der Hydrochlorothiazidbehandlung - eine Gewichtsreduzierung von 4,5 kg im Vergleich zu dem Leerwert vom 15.8. - dem Tag vor der Placeboeinnahme - festgestellt.

Patient	Datum					
	15.8.	17.8.	21.8.	24.8.	28.8.	31.8.
	Leer	Hydrochlorothiazid				
E.R.	81,3	79,5	79,7	79,7	80,3	80,3
K.O.	71,8	69,8	70,0	70,0	70,2	70,4
T.U.	82,5	81,8	81,5	81,2	81,5	80,8
	Leer	Placebo				
S.E.	79,1	77,5	77,5	79,0	78,7	78,7
P.O.	86,5	85,7	86,5	85,3	86,4	86,2
W.A.	104,0	105,0	105,0	105,0	105,0	105,0

7.9.

78,9

70,6

81,8

77,6

86,1

105,0

B.

Patient	Datum		6.11.	9.11.	13.11.	16.11.	19.11.	23.11.	27.11.	30.11.
	Leer		Placebo							
E.R.	81,7		81,5	81,4	81,4	81,4	81,7	81,0	81,8	82,0
K.O.	71,7		71,8	71,9	71,8	71,8	71,6	71,4	71,5	71,3
T.U.	80,9		80,0	80,2	80,2	78,0	79,8	78,5	78,9	79,8
Hydrochlorothiazid										
	Leer									
S.E.	79,2		79,0	78,7	78,5	78,5	77,8	76,8	76,7	77,3
P.O.	82,0		81,0	81,5	80,2	80,2	80,0	80,0	80,4	80,0
W.A.	105,0		104,5	101,0	101,0	101,0	101,1	101,0	101,0	101,0

Tabelle 32: Mittlere Konzentration der Triglyceride (TG) und des Cholesterins (CHOL) im Plasma und in den Lipoproteinfraktionen (VLDL, LDL, HDL) und der Palmitin-(C₁₆), Stearin-(C₁₈), Öl-(C_{18:1}) und Linolsäure (C_{18:2}) im Plasma bei 10 Rauchern. In Spalte I sind die Werte vor dem Rauchen, in Spalte II die Werte 1/2 Stunde nach dem Rauchen von 2 Zigaretten aufgeführt. Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$.

Lipide	I "vor"	II "nach"
Plasma-TG	1740 $\pm$ 690	1660 $\pm$ 670
VLDL-TG	820 $\pm$ 370	860 $\pm$ 480
LDL-TG	400 $\pm$ 170	410 $\pm$ 190
HDL-TG	210 $\pm$ 70	200 $\pm$ 50
Plasma-CHOL	6720 $\pm$ 2210	6670 $\pm$ 2110
VLDL-CHOL	550 $\pm$ 340	510 $\pm$ 320
LDL-CHOL	3840 $\pm$ 1610	3980 $\pm$ 1870
HDL-CHOL	1440 $\pm$ 130	1420 $\pm$ 200
C ₁₆	219 $\pm$ 105	221 $\pm$ 75
C ₁₈	80 $\pm$ 27	91 $\pm$ 29
C _{18:1}	205 $\pm$ 131	214 $\pm$ 105
C _{18:2}	102 $\pm$ 51	101 $\pm$ 34

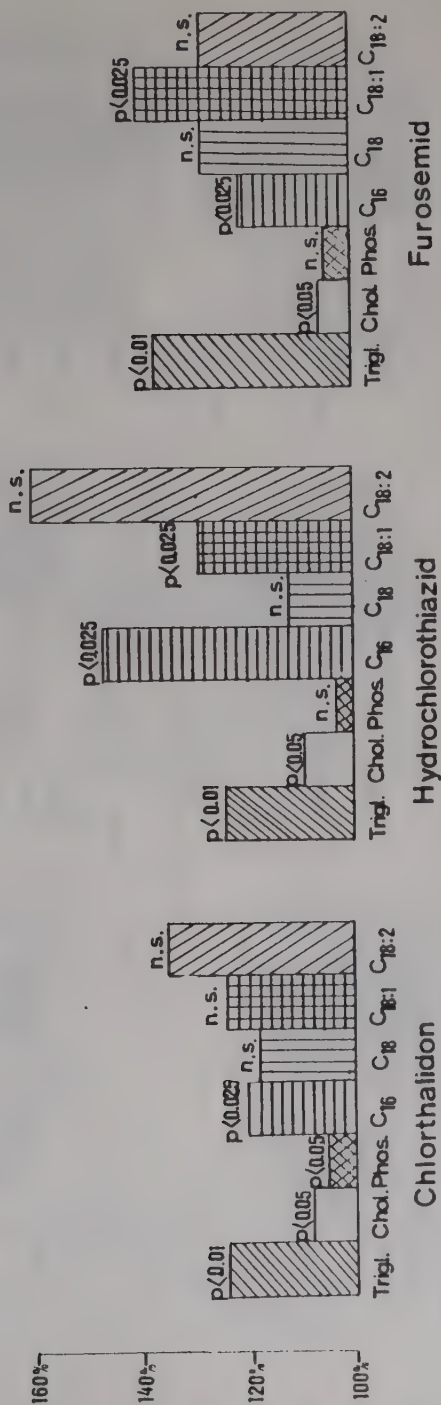
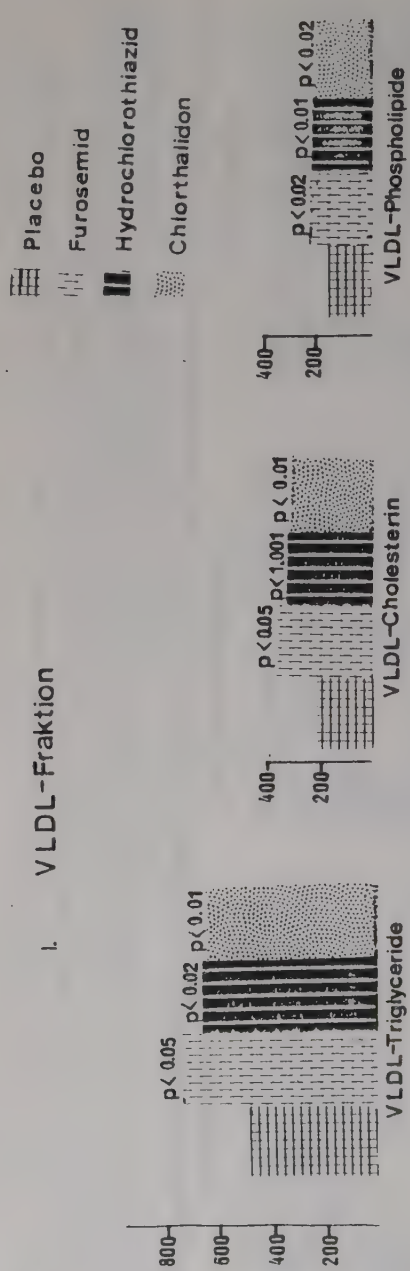


Abb. 10:
 Prozentualer Anstieg gegenüber der Placeboperiode bei den Triglyceriden, dem Cholesterin und den Phospholipiden von 12 Probanden und bei den freien Fettsäuren von 8 Probanden nach jeweils dreiwöchiger Verabreichung von Chlorthalidon (100mg/d), Hydrochlorothiazid (100mg/d), Furosemid (80mg/d) oder Placebo. Die mittlere Konzentration der Placebo-Periode wurde gleich 100% gesetzt.
 Trigl.: Triglyceride; Chol: Cholesterin, Phos: Phospholipide, C_{16} : Palmitin-, C_{18} : Stearin-, $C_{18:1}$: Öl-, $C_{18:2}$: Linolsäure.

I. VLDL-Fraktion



II. LDL-Fraktion

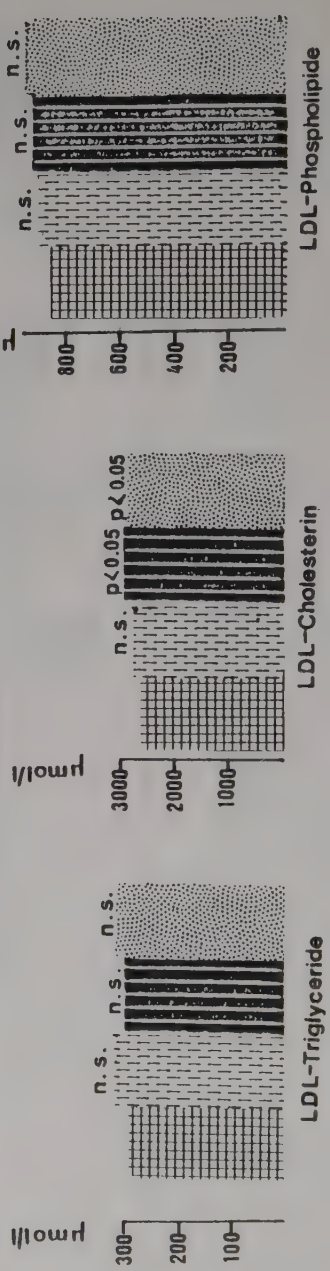


Abb. 11, I-III: Konzentrationsänderungen der Lipide in der VLDL-, LDL- und HDL-Fraktion bei 12 Probanden nach

III. HDL-Fraktion

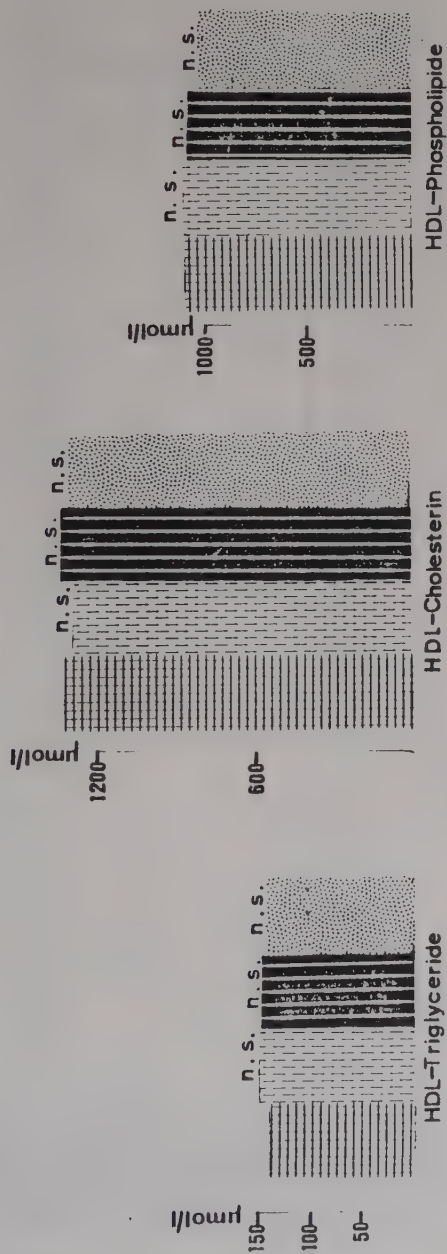


Abb. 11, III.

I.

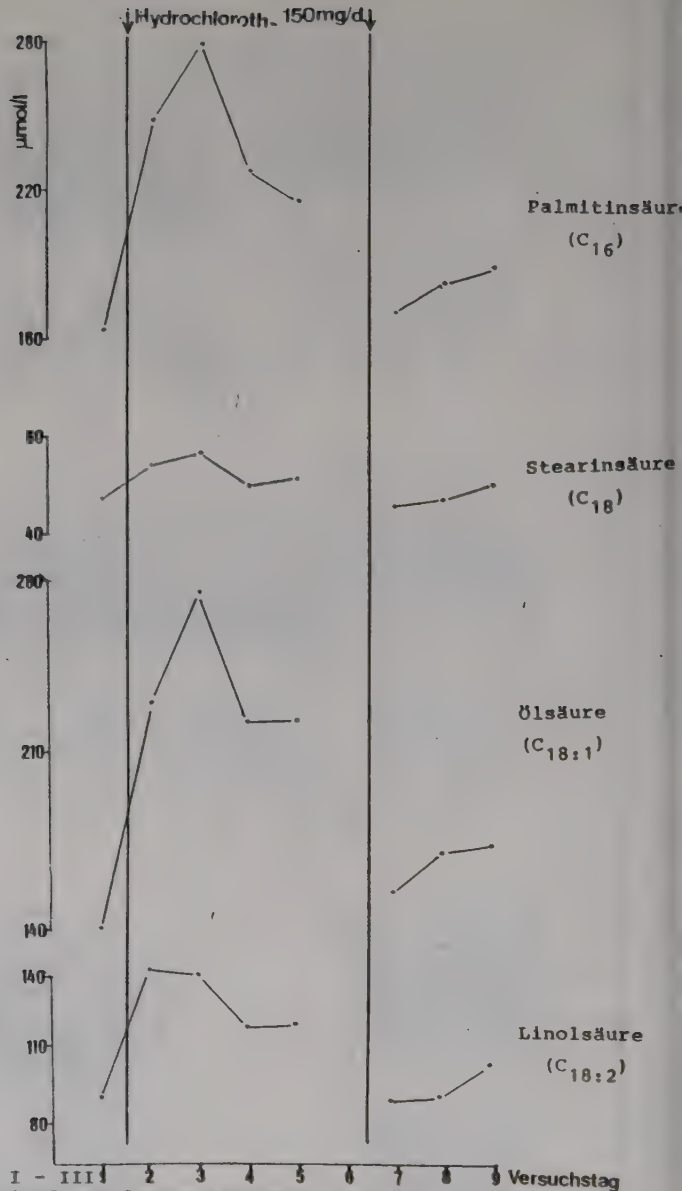


Abb. 12, I - III Kurvenverlauf der freien Fettsäuren von 6 bis 8 Probanden unter einer tägl. Hydrochlorothiazid-Gabe von 150 (I), 100 (II) und 50mg (III). Der durch die beiden senkrechten Linien markierte Bereich umfaßt die Medikament-Periode. Es sind die Versuchstage gegen die Mittelwerte der Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen.

II.

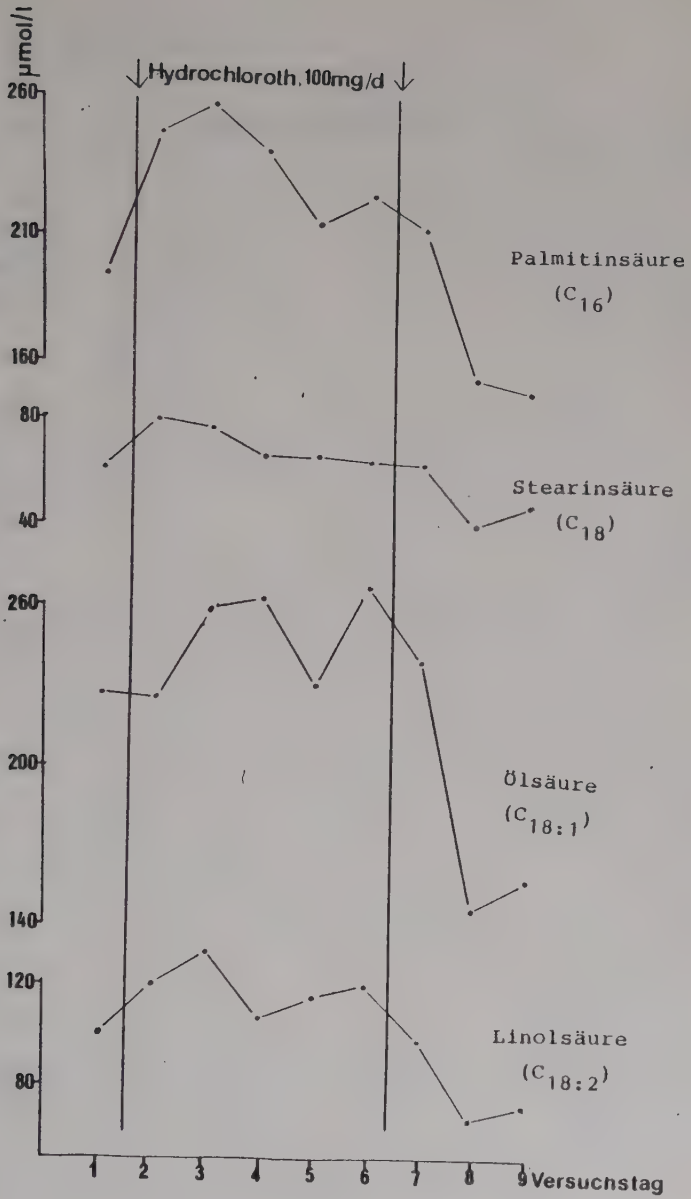


Abb. 12, II.

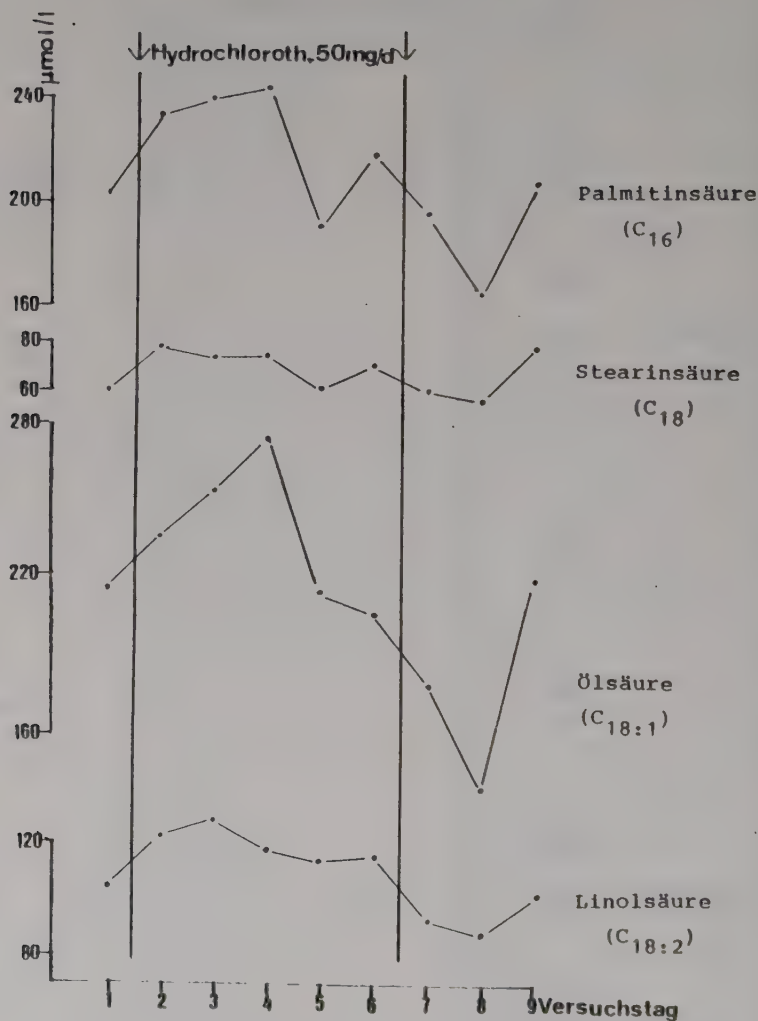


Abb. 12, III.

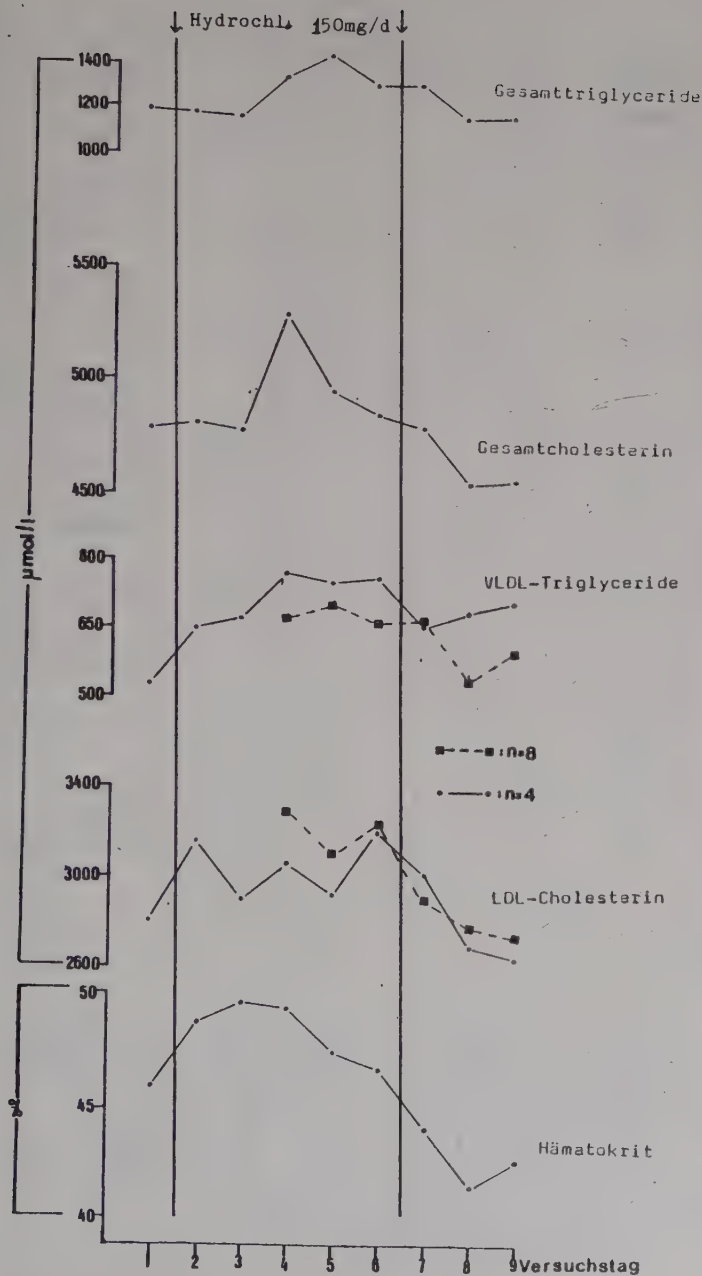


Abb. 13, I - III:
 Kurvenverlauf der Gesamt- und VLDL-Triglyceride, des Gesamt- und LDL-Cholesterins und des Hämatokrits über 9 Tage. Der durch die beiden senkrechten Linien markierte Bereich umfaßt die Medikamenten-Periode. Es wurden tgl. jeweils 150 (I), 100 (II) und 50mg (III) Hydrochlorothiazid verabreicht. Es sind die Versuchstage gegen die Mittelwerte der Konzentrationen von 6 bzw. 8 Probanden aufgetragen. Wegen eines technischen Defekts der Ultrazentrifuge ist die Fraktionierung der Plasmalipoproteine bei der 150mg-Dosis (I) nur 2.T. gelungen, so daß die Kurven der VLDL- und LDL-Fraktion am 1., 2. und 3. Versuchstag aus den Werten von 4 Probanden gebildet wurden.

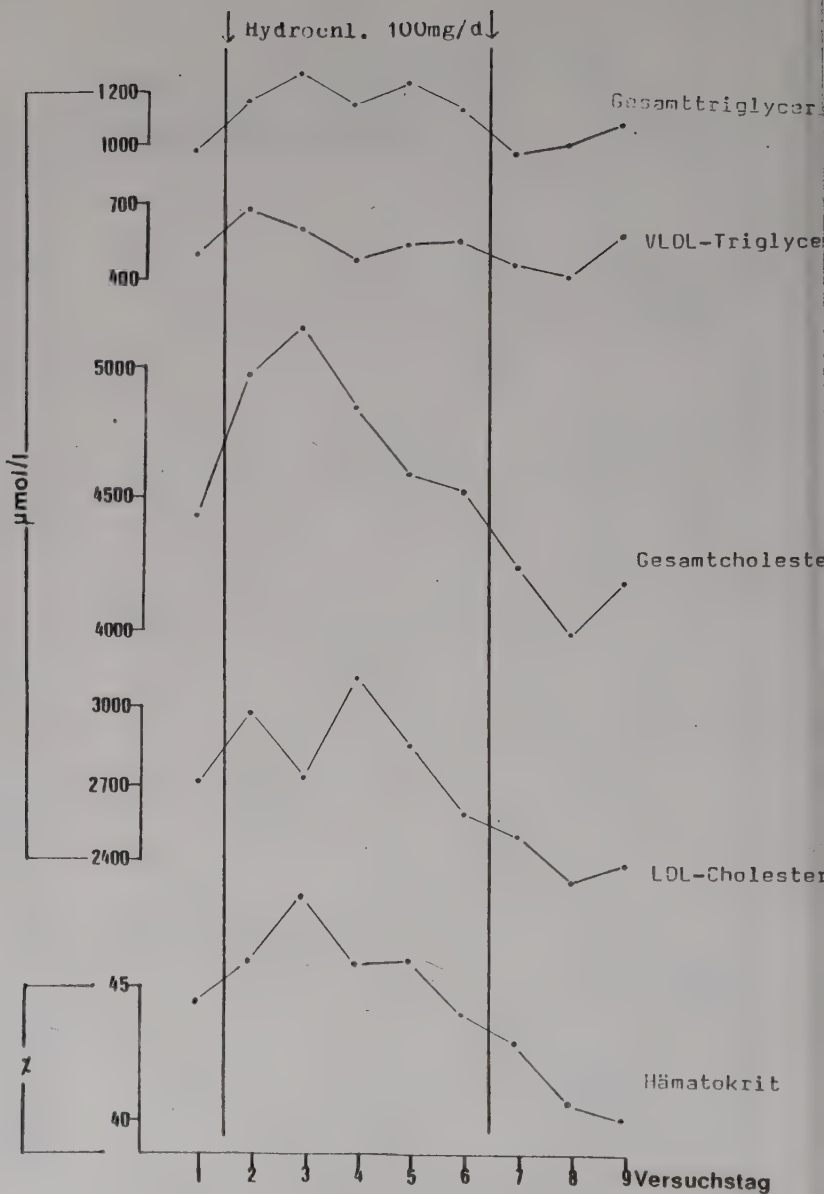


Abb. 13, II.

III.

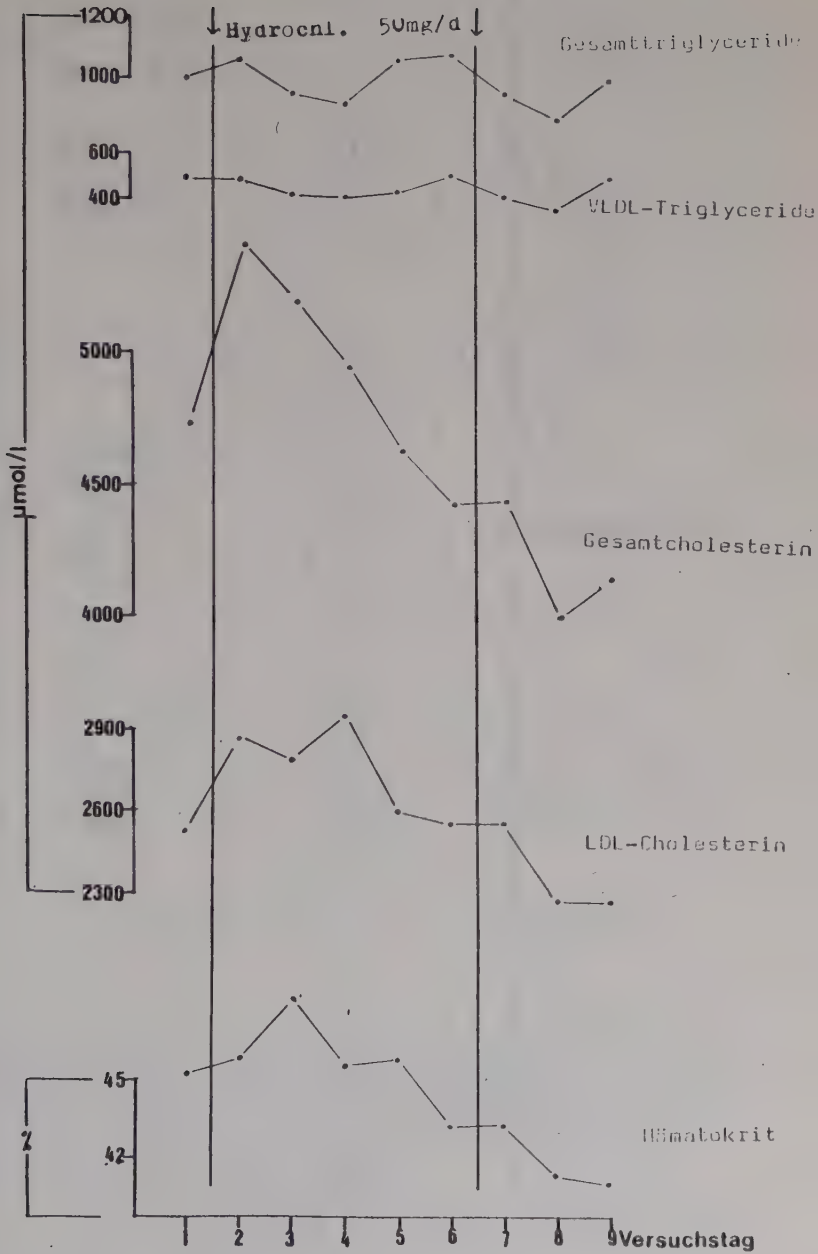


Abb. 13, III.

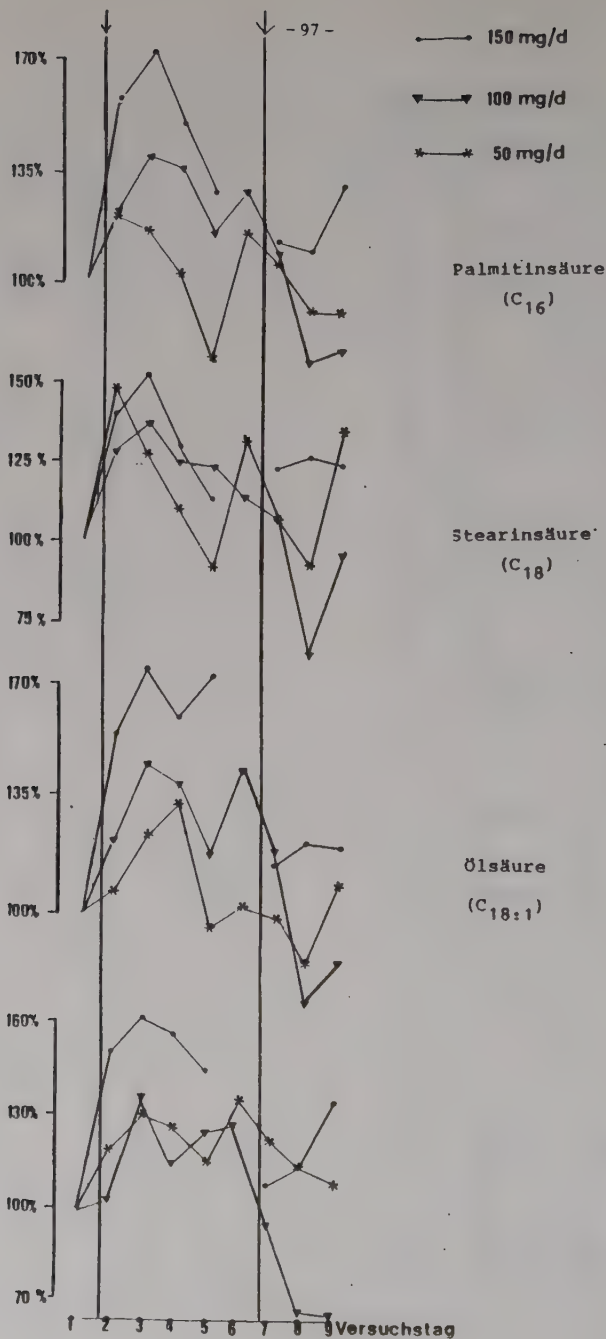


Abb. 14:
Kursverlauf der Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäure nach einer Hydrochlorothiazid-Gabe von 150mg/d, 100mg/d und 50mg/d jeweils über 5 Tage. Der durch die beiden senkrechten Linien markierte Bereich umfaßt die Medikament-Periode. Es sind die Versuchstage gegen die Konzentrationen der freien Fettsäuren in % aufgetragen. Der Konzentrationswert des Tages vor der Medikamenteneinnahme wurde für 100% angenommen.

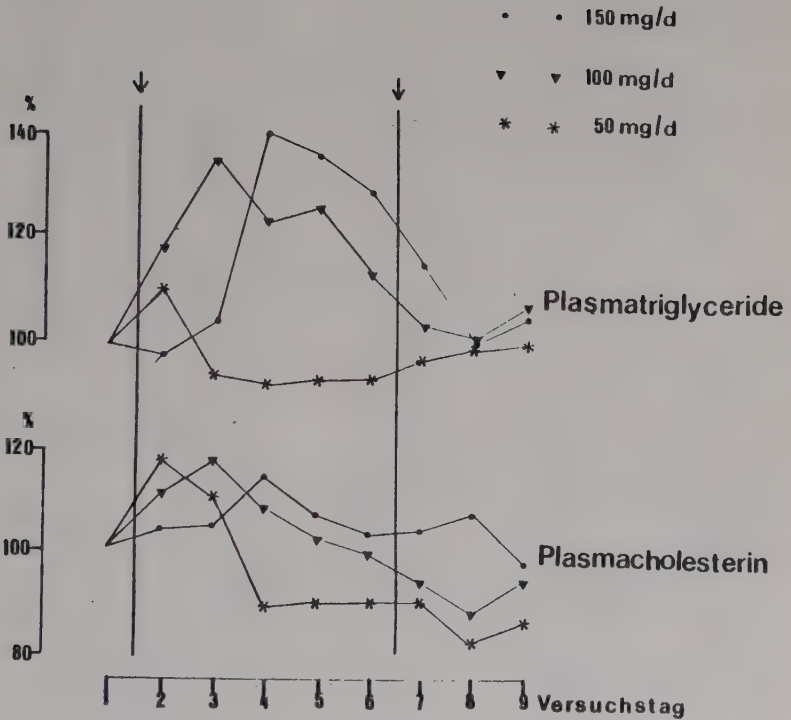
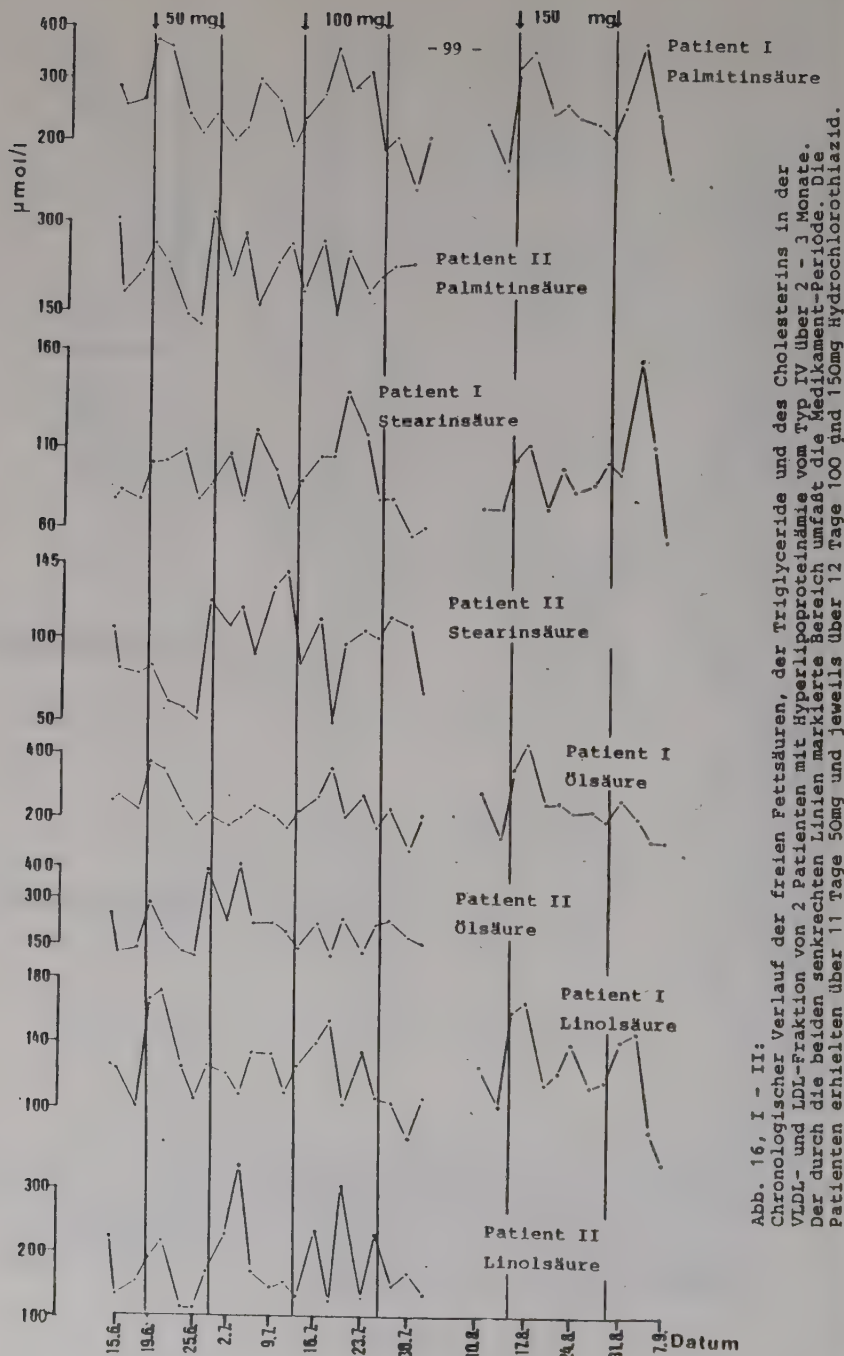


Abb. 15:

Kurvenverlauf der Triglyceride und des Cholesterins im Plasma nach einer Hydrochlorothiazid-Gabe von 150mg/d, 100mg/d und 50mg/d jeweils über 5 Tage. Der durch die beiden senkrechten Linien markierte Bereich umfaßt die Medikament-Periode. Es sind die Versuchstage gegen die Lipidkonzentrationen in % aufgetragen. Der Lipidwert des Tages vor der Medikamenteneinnahme wurde für 100% angenommen.



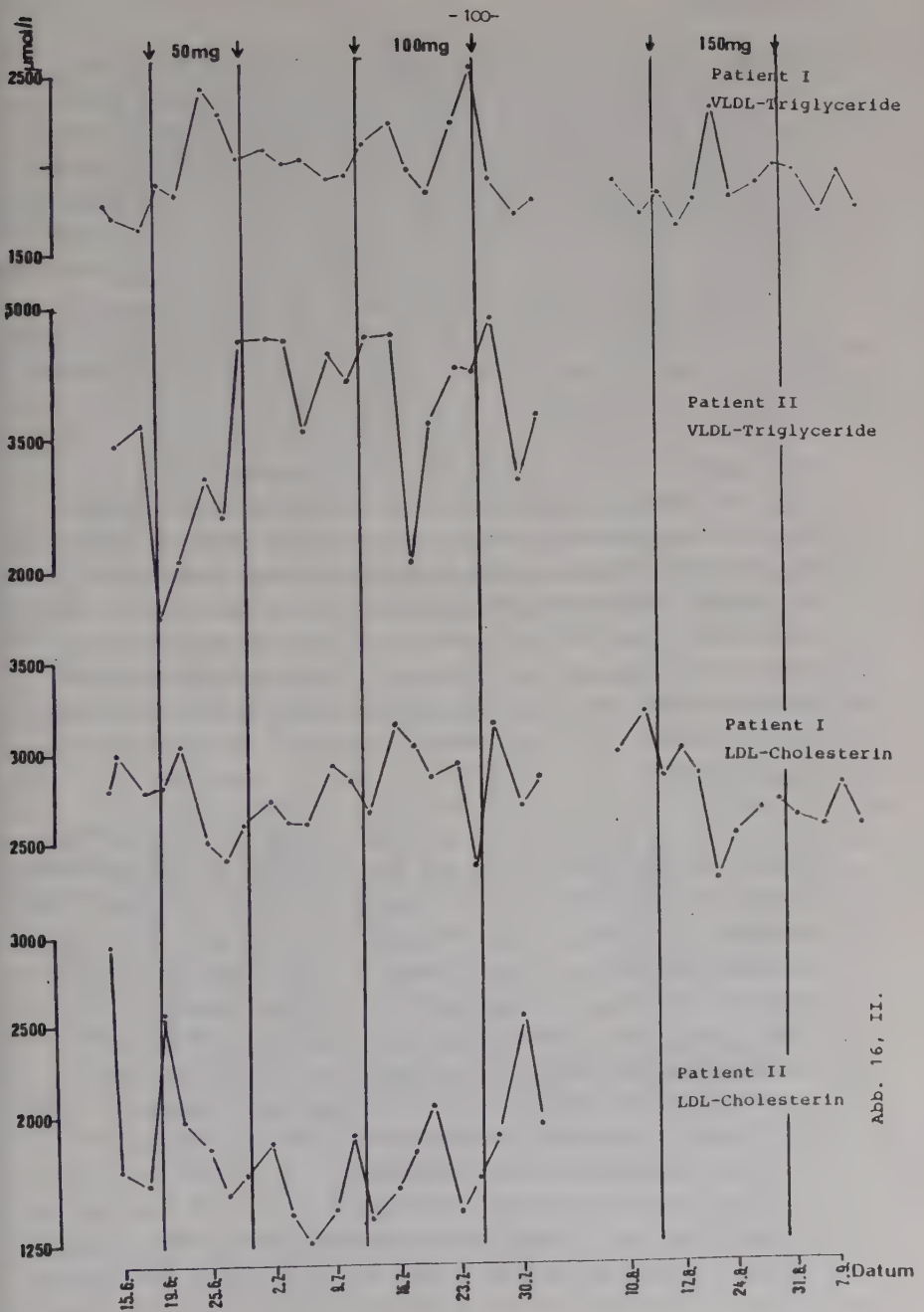


Abb. 16, II.

IV DISKUSSION

Im Jahre 1976 stellten AMES und HILL bei hypertensiven Patienten, die mit Chlorthalidon behandelt wurden, eine Erhöhung des Serumtriglycerid- und Serumcholesterinspiegels fest. Außer AMES und HILL berichteten auch andere Autoren in den letzten Jahren über die Auswirkung der Diuretika auf die Plasmalipide. Die Tabelle 33 gibt eine Übersicht über die wichtigsten zu diesem Thema veröffentlichten Arbeiten. Dabei wurden teilweise widersprüchliche Ergebnisse ermittelt. Der Grund hierfür kann darin liegen, daß nicht alle Faktoren, die Einfluß auf das Ergebnis nahmen, berücksichtigt wurden.

Bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde z.B. darauf geachtet, daß zeitgleiche Behandlungsperioden verglichen wurden und daß die Probanden hinsichtlich ihres Gesundheitszustandes, ihrer rassischen Abstammung, ihres Geschlechts, ihres Alters, ihrer Ernährungsgewohnheiten, des Tabak- und Alkoholgenusses und ihrer beruflichen Aktivität möglichst ähnlich waren. Auf diese Weise wurde ein möglichst einheitliches Kollektiv erhalten, wodurch die ohnehin große Variation der Plasmalipoprotein-Spiegel und der freien Fettsäure so stark wie möglich eingeschränkt werden sollte.

Ein anderer Faktor, der bei dieser Arbeit berücksichtigt wurde, ist die Häufigkeit und der Zeitraum der Blutabnahme. Versuche, bei denen beispielsweise nur eine einmalige Blutabnahme nach einer Medikamentenbehandlung erfolgt (GLUCK, HELGELAND), können keine sichere Aussage über den Lipidspiegel liefern. Der Stoffwechsel der Plasmalipide unterliegt der Wirkung mehrerer, durch Hormone stimulierbarer Enzyme (Insulin, Adrenalin, Glucagon, STH). Diese verursachen beträchtliche Schwankungen der Lipidkonzentrationen im Plasma. Konzentrationsänderungen machen sich besonders bei den freien Fettsäuren bemerkbar. Dies hängt mit ihrer geringen biologischen Halbwertszeit von 1 bis 3 Minuten zusammen. Bei den eigenen Untersuchungen wurde daher während einer 3-wöchigen Medikamentgabe zur Bestimmung des Lipidspiegels 1 mal pro Woche Blut abgenommen. Bei dem Versuch

D, bei welchem der Lipidverlauf von 2 Fettstoffwechselkranken mit Hyperlipoproteinämie vom Typ IV nach Fredrickson über 2 bis 3 Monate verfolgt wurde, wurde deutlich, daß die Lipidkonzentrationen der Kranken mit Hyperlipoproteinämie besonders starke Schwankungen zeigen (Abb. 16). Sowohl die freien Fettsäuren als auch die Triglyceride und das Cholesterin in den Lipoprotein-Fraktionen zeigten Schwankungen, die teilweise innerhalb von 2 Tagen größer als 100% waren. Daher wurde bei den weiteren Untersuchungen an Fettstoffwechselkranken eine im Vergleich zu den gesunden Probanden längere, 4-wöchige Medikament- und Kontroll-Periode eingehalten. Die Blutabnahme zur Bestimmung der Plasmalipide erfolgte 2mal wöchentlich.

Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse hängt auch von der Präzision der angewandten analytischen Methoden ab. Für die Bestimmung der freien Fettsäuren wurde die Gaschromatographie bevorzugt. Sie ermöglichte die Auftrennung der freien Fettsäuren in Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäure. Die Qualitätskontrolle der gaschromatographischen Methode ergab für die freien Fettsäuren eine konstante Wiederfindung von 80%. Der 20%-ige Verlust ist auf Verluste während des Extraktions- und Methylierungsvorgangs zurückzuführen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden aber dadurch nicht beeinflußt, da bei den Bestimmungen für die Ermittlung der Wiederfindungsrate das Verhältnis authentischer zu gemessenen Konzentrationen konstant blieb. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für die freien Fettsäuren lag zwischen 88% und 96% und für die übrigen Lipide im Gesamtplasma und in den Lipoprotein-Fraktionen zwischen 97% und 98% bzw. 82% und 96,5%. Die Konzentrationsänderungen der Lipide unter Diuretika lagen deutlich außerhalb des Fehlerbereichs der analytischen Methoden.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen behandelt:

1. Welchen Einfluß haben Chlorthalidon, Hydrochlorothiazid und Furosemid auf die Gesamtlipide, die Lipoproteinfractionen und die freien Fettsäuren im Plasma gesunder Probanden?
2. Zu welchem Zeitpunkt tritt die Wirkung der Diuretika auf die Lipidkonzentrationen im Plasma ein?
3. Ist die Lipidkonzentrationsänderung unter Diuretika dosisabhängig?
4. Welchen Einfluß zeigen Thiazid-Diuretika auf den Plasmaspiegel der Gesamtlipide, der Lipoproteinfractionen und der freien Fettsäuren bei Patienten mit Hyperlipoproteinämie vom Typ IV und II_b nach Fredrickson?

Der bereits von anderen Autoren erwähnte Anstieg der Plasmatriglyceride und des Plasmacholesterins unter Diuretika wurde durch einen cross-over Versuch an 12 gesunden Probanden bestätigt, die für je 3 Wochen täglich 100mg Chlorthalidon, 100mg Hydrochlorothiazid oder 80mg Furosemid erhielten. Zusätzlich wurde auch gezeigt, daß dieser Lipidanstieg nicht - wie AMES und HILL angenommen hatten - in Beziehung zu einer Vorerkrankung wie z.B. Hypertonie steht, weil dieser Versuch mit gesunden Probanden durchgeführt wurde.

Durch Fraktionierung der Plasmalipoproteine mittels Ultrazentrifugation zeigte sich jetzt zum ersten Mal, daß

1. die gesamte VLDL - Fraktion, d.h. die VLDL-Triglyceride, das VLDL-Cholesterin und die VLDL-Phospholipide unter allen drei Diuretika ansteigt,
2. das LDL-Cholesterin unter Chlorthalidon und Hydrochlorothiazid ebenfalls ansteigt und
3. die HDL-Fraktion unter Diuretika unverändert bleibt.

Zum ersten Mal wurde auch nachgewiesen, daß die freien Fettsäuren Palmitin- und Ölsäure unter Diuretikum ansteigen. Dieser Anstieg war jedoch für Ölsäure unter Chlorthalidon nicht signifikant. Die Palmitinsäure stieg um 20% bis 47%. Dies entsprach etwa dem Anstieg der VLDL-Fraktion von 30% bis 57%. Der Anstieg der Ölsäure von 29% bis 35% war geringer.

Das LDL-Cholesterin korrelierte nicht mit dem VLDL-Cholesterin (Abb. 17). Dies könnte gegen die Annahme sprechen, daß sich die LDL-Fraktion ausschließlich aus der VLDL-Fraktion im Plasma, während des Katabolismus der VLDL-Moleküle bildet (BILHEIMER 1972/EISENBERG 1973/SIGURDSSON 1975). Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ausschließlich auf Messungen des Lipid- und nicht des Apoproteinanteils der Lipoproteinfraktionen beruhen. Demzufolge kann nicht als gesichert gelten, daß Änderungen des Lipidanteils notwendigerweise eine Entsprechung im Apoproteinanteil finden. Allerdings finden sich Hinweise darauf, daß unter bestimmten Bedingungen wie Medikamenteneinnahme oder bei Fettstoffwechselstörungen eine de novo Synthese der LDL-Fraktion in der Leber stattfinden kann (STEINBERG 1977).

Der Anstieg der Lipide in den Lipoproteinfraktionen unter den drei Diuretika entsprach dem Muster der sekundären Hyperlipoproteinämie vom Typ IV nach Fredrickson. Die Plasmakonzentrationen bei den 12 gesunden Probanden blieben dabei allerdings noch innerhalb des Normbereichs.

Ein Anstieg der Lipide unter Diuretikum wurde auch bei Kranken mit Hyperlipoproteinämie vom Typ IV und II_b nach Fredrickson beobachtet. 6 Patienten mit Hyperlipoproteinämie - davon 3 vom Typ IV und 3 vom Typ II_b - erhielten jeweils über 4 Wochen täglich 100mg Hydrochlorothiazid und Placebo. Die Gesamttriglyceride und das Gesamtcholesterin im Plasma

erhöhten sich um 18% bzw. 4%. Dieser Anstieg war geringer als bei Gesunden. Der absolute Anstieg der Gesamttiglyceride von 524 μ mol/l bei den Patienten mit Hyperlipoproteinämie lag höher als der von 219 μ mol/l bei den gesunden Probanden (vgl. Tab. 34).

Ebenso wie bei den Gesunden fand sich bei den Kranken mit Hyperlipoproteinämie ein Anstieg der gesamten VLDL-Fraktion. Dieser war mit ca. 20% allerdings geringer als bei den Gesunden.

Bei den 6 Patienten mit Hyperlipoproteinämie veränderten sich die 3 Lipidbestandteile der LDL-Fraktion unterschiedlich. Während bei den 3 Patienten mit Hyperlipoproteinämie vom Typ II_b (Tab. 29) alle 3 LDL-Lipidbestandteile im gleichen Umfang, nämlich um 12 - 16% zunahmen, zeigte sich bei den 3 Patienten mit Hyperlipoproteinämie vom Typ IV eine eindeutige Erhöhung nur bei den LDL-Triglyceride (63%). Zusammenfassend ist also festzuhalten, daß unter Diuretikum die LDL-Triglyceride bei allen 6 Patienten zunahmen, während eine Erhöhung der gesamten LDL-Fraktion sich nur bei den Patienten mit Hyperlipoproteinämie vom Typ II_b ergibt.

Ebenso wie bei den Gesunden zeigte sich bei den Kranken mit Hyperlipoproteinämie unter Diuretika keine Veränderung der HDL-Fraktion.

Bei den 6 Patienten mit Hyperlipoproteinämie stieg ebenfalls die Plasmakonzentration der freien Fettsäuren um ca. 29% unter Hydrochlorothiazidbehandlung. Der prozentuale wie auch der absolute Anstieg der freien Fettsäuren unter Hydrochlorothiazid lag bei den Kranken mit Hyperlipoproteinämie niedriger als der bei den Gesunden (vgl. Tab. 34).

Da bei den zu diesem Thema veröffentlichten Arbeiten die Blutabnahme zur Bestimmung der Lipidkonzentrationen in größeren Zeitabständen erfolgte, fehlen die Informationen über den genauen Zeitpunkt des erstmaligen Anstiegs der Lipide unter Diuretikum. Deshalb wurde ein Versuch mit 8 gesunden Probanden durchgeführt, die jeweils eine Tagesdosis von 50, 100 und 150mg Hydrocholorothiazid über 5 Tage erhielten. Es fand eine tägliche Blutabnahme statt. Der Anstieg der freien Fettsäuren, der Gesamt- und VLDL-Triglyceride sowie des Gesamt- und LDL-Cholesterins trat bereits am 1. Tag nach Diuretikum-Gabe ein. Am nächsten Tag nahmen die Konzentrationen noch etwas zu, gingen aber dann trotz andauernder Diuretikumbehandlung zum Teil bis auf den Ausgangswert zurück (z.B. freie Fettsäuren unter der 50mg-Dosis, Abb. 12, III.).

Da auch der Hämatokrit an den ersten beiden Tagen unter Diuretikum um 7 - 9% anstieg, dann aber wieder auf den Ausgangswert abfiel, könnte sich der anfängliche Anstieg der Lipide als Konzentrierungseffekt deuten lassen. Dies kann jedoch nur ein Teileffekt sein, da zum einen die anfängliche prozentuale Erhöhung der Lipide von 15 bis 50% die des Hämatokrits weit übertraf, zum anderen auch nach Normalisierung des Hämatokrits am letzten Medikament-Tag Lipidanstiege beobachtet wurden (z.B. 5. Medikament-Tag für Palmitinsäure und Hämatokrit unter der 100- und 50mg-Dosis, Abb. 12,13 III). Hier muß man erwähnen, daß der Hämatokrit nach 3- bzw. 4-wöchiger Diuretikum-Gabe, sowohl bei den gesunden Probanden (Versuch A), als auch bei den Kranken mit Hyperlipoproteinämie (Versuch C) unverändert blieb. Demzufolge kann der Lipidanstieg unter Diuretikum nicht durch Hämokonzentration bedingt sein.

Der beobachtete Lipidverlauf über die 5 ersten Tage nach Diuretikum-Gabe läßt sich möglicherweise durch ein Zusammenspiel von Diurese bedingter initialer Hämokonzentration, versuchsbedingter kurzfristiger Änderung der Lebensgewohnheiten und schließlich der Wirkung des Medikaments erklären.

Festzuhalten bleibt hier, daß der Konzentrationsanstieg der Lipide unter Diuretikum bereits am 1. Tag nach Diuretikum-Gabe eintritt, endgültig aber sich nach einer 1 bis 3-wöchigen Diuretikumeinnahme auf höhere Werte einstellt.

Die verschiedenen Autoren stellen eine unterschiedliche prozentuale Erhöhung der Lipide unter Diuretikum fest (Tab. 32). Es stellt sich die Frage, ob diese unterschiedlichen Ergebnisse nicht aufgrund der von Autor zu Autor variierenden Tagesdosis zustandekommen. Zur Überprüfung des Lipidanstiegs auf Dosisabhängigkeit wurden die Werte von 4 Probanden, die alle drei Dosierungen (50, 100 und 150mg) Hydrochlorothiazid erhielten, miteinander verglichen. Nach den Dosis-Wirkungs-Kurven wurde nur für die Palmitin- und Ölsäure eine Dosisabhängigkeit deutlich (Abb. 14). Für die Stearin- und Linolsäure ließ sich keine eindeutige Abhängigkeit von der Diuretikum-Dosis erkennen. Eine treffsichere Aussage wurde dadurch erschwert, daß die Stearin- und Linolsäure in kleineren Konzentrationen im Serum auftreten und die Präzision der analytischen Methode für sie am geringsten ist (VK = 6,5% - 12%). Eine Dosisabhängigkeit des Anstiegs der freien Fettsäuren würde, da sie unter den gegebenen Versuchsbedingungen ausschließlich aus den Triglyceriden des Fettgewebes stammen, bedeuten, daß die Diuretika eine dosisabhängige stimulierende Wirkung auf die Lipolyse im Fettgewebe haben. Auch für die anderen Plasmalipide wurde unter einer Tagesdosis von Hydrochlorothiazid, im Bereich von 50 bis 150mg, keine Abhängigkeit von der Diuretikum-Dosis festgestellt (Abb. 15), was allerdings durch den zu flachen Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurven bedingt sein kann.

AMES und HILL schlossen aus ihren Ergebnissen auf eine Dosisabhängigkeit der Diuretikum-Wirkung auf den Cholesterinanstieg. Dies muß zunächst angezweifelt werden. Bei ihrem Versuch erhielten 11 Patienten eine Tagesdosis von 100mg Chlorthalidon. 24 andere Patienten erhielten 50mg Chlorthalidon/Tag oder eine ebenso geringe Tagesdosis eines anderen Diuretikums. Da nicht die gleichen Patienten die beiden Do-

sierungen einnehmen, sind individuelle Unterschiede nicht auszuschließen. Außerdem erfolgte die Medikamentenbehandlung nicht mit dem gleichen Diuretikum.

Über die mögliche Ursache des Lipidanstiegs unter Diuretikum liegen mehrere Vermutungen vor (AMES und HILL, HELGEIAND, SCHOENFELD).

Die vorliegende Arbeit konnte einen Zusammenhang zwischen dem Anstieg von Harnsäure und dem der Lipide, der von BERKOWITZ (1964) postuliert wurde, nicht bestätigen. Der Anstieg der Harnsäure korrelierte unter keinem der Diuretika mit dem Lipidanstieg. Chlorthalidon rief nach 3-wöchiger Gabe eine Hyperuricämie hervor. Die Harnsäurekonzentrationen nach Hydrochlorothiazid- und Furosemid-Gabe erreichten die obersten Grenzwerte des Normbereichs (Tab.23).

Einem Anstieg der Lipide und Lipoproteine im Plasma könnte eine erhöhte Synthese, ein gedrosselter Abbau oder eine Veränderung der Lipolyse in der Peripherie bzw. in der Leber zugrundeliegen. Die Arbeit von SENFT (1966) über die Wirkung der Thiazide auf den Lipidstoffwechsel könnte eine mögliche Erklärung liefern. Er fand, daß die Thiazid-Diuretika die 3,5-AMP-Phosphodiesterase hemmen. Sie würden dadurch einen Anstieg des cAMP hervorrufen, der zu einer Steigerung der Lipolyse im Fettgewebe führt (HIMMS-HAGEN, 1972). Mit dieser Deutung stünde die beobachtete Zunahme der freien Fettsäuren im Serum während der Diuretikum-Behandlung in Einklang. Da die freien Fettsäuren im Nüchternzustand nur aus der Lipolyse im Fettgewebe stammen, ist die Zunahme der Serumkonzentration der freien Fettsäuren Zeichen für die verstärkte Lipolyse im Fettgewebe. Durch den Anstieg der freien Fettsäuren im Plasma wird jedoch die VLDL-Synthese in der Leber gesteigert, so daß der Anstieg der VLDL im Plasma auf diese Weise zu erklären wäre. Es könnte allerdings auch sein, daß die Diuretika durch ihre indirekte Stimulierung von adrenerischen β -Rezeptoren zum Anstieg des cAMP führen, denn es

ist bekannt, daß unter der diuretischen Therapie der periphere Widerstand absinkt und dadurch reaktiv der Tonus des Sympathicus ansteigt.

Um die klinische Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse endgültig beurteilen zu können, werden weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet folgen müssen. Festzuhalten bleibt hier, daß der Anstieg der freien Fettsäuren, der VLDL-Triglyceride und des LDL-Cholesterins unter Diuretikumbehandlung bei gesunden Personen nicht die Grenzwerte des Normbereichs überschritten. Es kann also nicht von einer Diuretikum-bedingten Hyperlipoproteinämie gesprochen werden.

Tabelle 33: Die wichtigsten Arbeiten über den Einfluß der Diuretika auf die Plasma-lipide

Author	Probanden	Diuretikum	Dosis	Diuretikum-einnahme	Ergebnisse
SCHOENFELD (1964)	6 herzkranke Patienten	Bendroflumethiazid	5mg/Tag	4 Wochen	Serumcholesterin: Anstieg 19%
JOHNSON (1974)	14 Hypertoniker 78 "	Hydrochloroth. Thiazide	50mg/Tag ?	4 Wochen 6 Monate	Serumtriglyceride: " 28% prä- β -Lipoproteine: "
AMES u. HILL (1976)	39 "	Chlorthalidon	100mg/Tag oder 2 x 50mg/Wo.	im Mittel	Serumtriglyceride: " 24%
		Hydrochloroth. Spironolacton	25 - 50mg/Tag 25 - 50mg/Tag	6 Monate	Serumcholesterin: " 5%
CHRYSANTH (1976)	18 "	Hydrochloroth.	100mg/Tag	9 Monate	Plasmatr triglyceride: keine Plasmacholesterin: Veränderung
SCHNAPPER (1977)	311 "	Chlorthalidon	50 oder 100mg/Tag	12 Monate	Plasmatr triglyceride: um 14mg/dl Plasmacholesterin: 5%
HELGE LAND (1978)	150 "	Hydrochloroth.	50mg/Tag	3 Jahre	Plasmatr triglyceride: keine Plasmacholesterin: Veränderung
BAUMGARTNER (1978)	5 Gesunde u. 5 Hypertoniker	Chlorthalidon Furosemid Me frusid	100mg/Tag 80mg/Tag 50mg/Tag	jeweils über 4 Wochen	Plasmatr triglyceride: keine Plasmacholesterin: Veränderung β -Lipoproteine: Anstieg
GRIMM (1978)	60 Hypertoniker	Hydrochloroth. Chlorthalidon	100mg/Tag " "	6 Wochen	Plasmacholesterin: Anstieg um 23,6mg/dl IDL : " 12,7mg/dl VLDL : " 9,1mg/dl Plasmatrigl. : " 29,6mg/dl
GLUCK (1979)	23 "	Chlorthalidon	100mg/Tag	6 Wochen	IDL-Cholesterin : Anstieg 17% β -Lipoproteine : " 8% Serumcholesterin, -triglyceride, - Phospholipide u. HDL: unverändert
JOOS (1980)	12 Gesunde	Hydrochloroth. Chlorthalidon Furosemid	100mg/Tag 100mg/Tag 8mg/Tag	jeweils über 3 Wochen	VLDL-Fraktion: Anstieg 30 - 5% IDL-Cholesterin: " 5 - 10% HDL-Fraktion: unverändert Freie Fettsäuren: Anstieg 20 - 47% Plasmatr triglyceride: " 24 - 37% Plasmacholesterin: " 6 - 9%

Tabelle 34: Prozentualer und absoluter Anstieg der Plasmakonzentration der freien Fettsäuren, der Gesamttriglyceride und des Gesamtcholesterins sowie der Triglyceride, des Cholesterins und der Phospholipide in der VLDL- und der LDL-Fraktion bei Gesunden und Kranken mit Hyperlipoproteinämie der Typen II_b und IV unter Hydrochlorothiazideinnahme

Die Werte der Gesunden stammen aus dem Versuch A und die der Kranken aus dem Versuch C. 12 Gesunde erhielten über 3 und 6 Kranke über 4 Wochen jeweils täglich 100mg Hydrochlorothiazid und Placebo.

	Gesunde		Kranke		
<u>1. Gesamtplasma</u>					
Freie Fettsäuren	37%	(46 $\mu\text{mol/l}$)	29%	(42 $\mu\text{mol/l}$)	
Triglyceride	24%	(219 $\mu\text{mol/l}$)	18%	(524 $\mu\text{mol/l}$)	
Cholesterin	9%	(380 $\mu\text{mol/l}$)	4%	(298 $\mu\text{mol/l}$)	
<u>2. VLDL-Fraktion</u>					
VLDL-Triglyceride	40%	(186 $\mu\text{mol/l}$)	20%	(319 $\mu\text{mol/l}$)	
VLDL-Cholesterin	38%	(84 $\mu\text{mol/l}$)	23%	(198 $\mu\text{mol/l}$)	
VLDL-Phospholipide	37%	(55 $\mu\text{mol/l}$)	17%	(30 $\mu\text{mol/l}$)	
<u>3. LDL-Fraktion</u>					
LDL-Triglyceride	-	-	Typ II _b	16%	(86 $\mu\text{mol/l}$)
			Typ IV	63%	(334 $\mu\text{mol/l}$)
LDL-Cholesterin	11%	(282 $\mu\text{mol/l}$)	Typ II _b	15%	(790 $\mu\text{mol/l}$)
			Typ IV	-	-
LDL-Phospholipide	-	-	Typ II _b	12%	(185 $\mu\text{mol/l}$)
			Typ IV	-	-

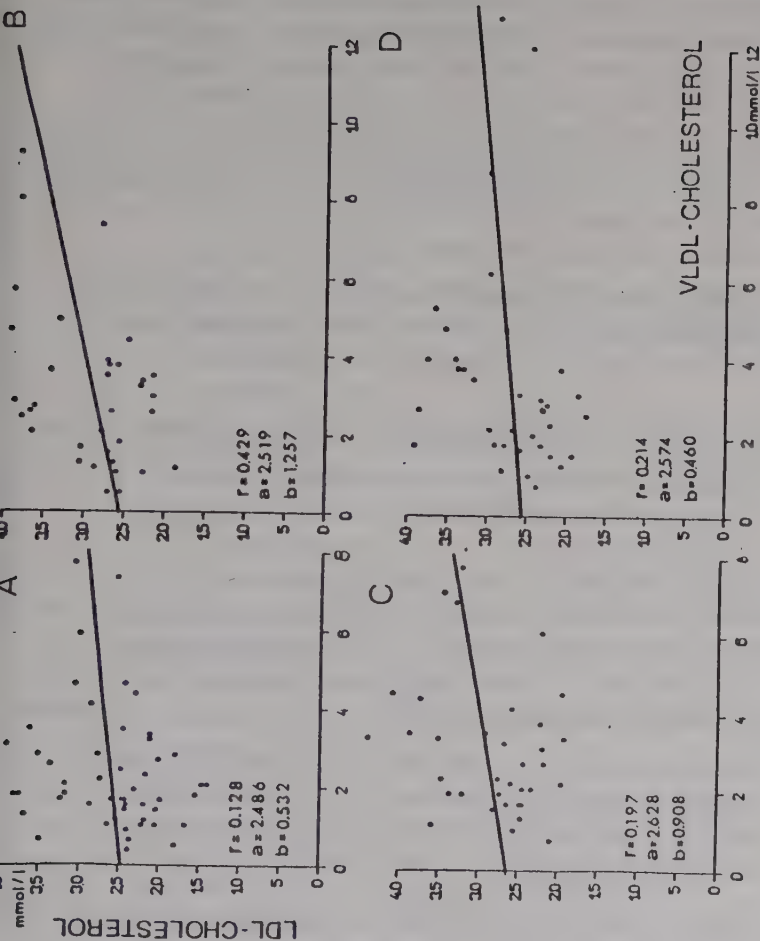


Abb. 17:
Korrelation zwischen LDL- und VLDL-Cholesterol bei der Placebo- (A), der Chlorthalidon- (B),
der Hydrochlorothiazid- (C) und der Furosemid-periode (D).

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß von Diuretika auf Konzentrationen von freien Fettsäuren, Gesamtlipiden und Lipide in den Lipoproteinfraktionen im menschlichen Plasma untersucht.

12 männliche Probanden erhielten im Rahmen eines kontrollierten klinischen Versuchs in cross-over Anordnung und in randomisierter Reihenfolge der Behandlungsperioden über jeweils drei Wochen täglich 100mg Hydrochlorothiazid, 100mg Chlorthalidon, 80mg Furosemid und Placebo.

6 männliche Patienten mit Hyperlipoproteinämie der Typen II_b und IV nach Fredrickson wurden mit gleicher Anordnung jeweils vier Wochen lang mit täglich 100mg Hydrochlorothiazid und Placebo behandelt.

Bei 4 männlichen Probanden konnte die Dosisabhängigkeit der Veränderungen bei Einnahme von 50, 100 und 150mg Hydrochlorothiazid über jeweils 5 Tage untersucht werden.

Zur quantitativen Analyse wurden folgende Methoden benutzt:

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| - freie Fettsäuren | : Gaschromatographie |
| - Lipoproteinfraktionierung: | Ultrazentrifugation |
| - Triglyceride | : enzymatisch |
| - Cholesterin | : enzymatisch |
| - Phospholipidtrennung | : Dünnschichtchromatographie |
| - Phospholipide | : Spektrophotometrie |

Die Diuretikaeeinnahmen hatten folgende wesentliche Effekte:

1. Erhöhung in der very low density lipoprotein (VLDL)-Fraktion gesunder Probanden der Konzentrationen von Triglyceriden um 40 - 50%, von Cholesterin um 40 - 50% und der Phospholipide um 30 - 40%.
2. Erhöhung um jeweils ca. 20% der Konzentrationen von Triglyceriden, Cholesterin und Phospholipiden in der VLDL-Fraktion bei Patienten mit Hyperlipoproteinämie der Typen IV und II_b.

3. Erhöhung der Cholesterinkonzentration der low denitiy lipoprotein (LDL)-Fraktion um 10% bei gesunden Probanden unter Hydrochlorothiazid- und Chlorthalidon-Einnahme.
4. Patienten mit Typ IV-Hyperlipoproteinämie zeigten einen Anstieg der Triglyceride um 60%, solche mit Typ II_b-Hyperlipoproteinämie einen Anstieg von Triglyceriden (15%), Cholesterin (15%) und Phospholipiden (10%) in der LDL-Fraktion.
5. Gesamttriglyceride und Gesamtcholesterin stiegen bei Probanden und Patienten während der Einnahme jedes der untersuchten Diuretika an.
6. Die Plasmakonzentrationen von Palmitinsäure stiegen bei den Probanden unter Einnahme aller untersuchten Diuretika um 20 - 40% an, die Ölsäurekonzentration jedoch nur bei Einnahme von Hydrochlorothiazid und Furosemid (30%).
7. Erhöhung um 20 - 30% der Plasmakonzentrationen der freien Fettsäuren bei Patienten mit Hyperlipoproteinämie der Typen IV und II_b.

Diese Ergebnisse könnten die Hypothese einer erhöhten hepatischen VLDL-Synthese als Folge erhöhter Fettsäurenkonzentration stützen. Verursacht wäre diese erhöhte Fettsäurenkonzentration durch verstärkte Lipolyse im Fettgewebe infolge diuretikabedingter Phosphodiesterasehemmung.

LITERATURVERZEICHNIS

- AMES R.P., HILL P. (1975a), Elevation of serum lipids induced by diuretic drugs in hypertension. J Clin Pharmacol 15: 552
- AMES R.P., HILL P. (1975b), Effect of different antihypertensive regimens on serum lipid concentrations (Abstract) Kidney Int 8: 436
- AMES R.P., HILL P. (1976), Elevation of serum lipid levels during diuretic therapy of hypertension. Am J Med 61: 748 - 757
- BAUMGARTNER G., GLÜCK Z., WEIDMANN P., PEHEIM E., FLAMMER J. (1978), Increased ratio between serum β - and α -lipoproteins during diuretic therapy (Abstract) Kidney Int. 13: 535
- BERKOWITZ D. (1964), Blood lipid and uric acid interrelationships. J Am Med Assoc 190: 856 - 858
- BILHEIMER D., EISENBERG S., LEVY R.I. (1972), The metabolism of Very Low Density Lipoprotein Proteins. Biochim. Biophys. Acta 260: 212 - 221
- CHRYSANT S.G., NELLER G.K., DILLARD B., FRÜHLICH E. (1976), Effects of diuretics on lipid metabolism in patients with essential hypertension. Angiology 27: 707 - 710
- CLAISIN L. (1894), Bemerkungen zu einer Mitteilung von A. Deninger "Über die Darstellung von Benzoesäureanhydrid". Ber Dtsch Chem Ges 27: 3182 - 3184
- EGGSTEIN M., KREUTZ F.H. (1966), Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blut (1. u. 2. Mitteilung). Klin Wochenschr 44: 262 - 273
- EISENBERG S., BILHEIMER D.W., LEVY R.I., LINDGREN F.T. (1973), On the metabolic conversion of human plasma very low density lipoprotein to low density lipoprotein. Bloch. et Bioph. Acta 326: 361 - 377
- GILLET M.P., BESTERMAN E.M. (1975), Plasmaconcentration of Lysolecithin and other phospholipids in the healthy population and in men suffering from arteriosclerotic diseases. Atherosclerosis 22: 111 - 124
- GLÜCK Z., WEIDMAN P., MORDASANI R., PEHEIM E., BACHMANN G., KEUSCH G., RIESEN W. (1979), Einfluß einer Diuretictherapie auf die Serumlipoproteine: ein unerwünschter Effekt? Schweiz Med Wochenschr 109: 104 - 108
- GNUCK G., SINGER P., THOELKE H., HONIGMANN G., SCHLIACK V. (1975), Das Fettsäuremuster der Triglyceride im Serum von Patienten mit Hyperlipoproteinämie sowie Diabetes mellitus im Vergleich zu Stoffwechselgesunden. Dt Gesundh.-Wesen 36: 1510 - 1513

GRIMM R.H., LEON A.S., HUNNINGHAKE D., BLACKBURY H. (1978), Diuretic affection on plasma lipids and lipoproteins. *Clinical Res* 26: 290A

GRÜNERT A. (1975), Die mikroanalytische, selective Bestimmung der unveresterten langkettigen Fettsäuren im Serum. *Klin Chem Klin Biochem* 13: 409 - 412

HATCH F.T. (1968), Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv Lipid Res* 6: 1 - 68

HELGELAND A., HJERMANN I., HOLME I., LEREN P. (1978), Serum triglycerides and serum uric acid in untreated and thiazidetreated patients with mild hypertension. *Am J Med* 64: 34 - 38

HIMMS-HAGEN J. (1972), Effects of catecholamines on metabolism. In: BLASCHKO, H., MUSCHOLL, E. (eds.), *Catecholamines (Handbook of experimental pharmacology, Vol. 33)*, Springer, Berlin Heidelberg New York PP 363 - 462

JOHNSON B., BYE C., LABROOY J., MUNRO-FAURE D., SLACK J. (1974), The relation of antihypertensive treatment to plasma lipids and other vascular risk factors in hypertensives. *Clin Sci Mol Med* 47: 9 - 10

JOOS C., KEWITZ H., REINHOLD-KOURNIATI D. (1980), Effects of Diuretics on Plasma Lipoproteins in Healthy Men. *Eur J Clin Pharmacol* 17: 251 - 257

KAISER R., *Chromatographie in der Gasphase, I Gas-Chromatographie*. In: *Hochschultaschenbücher-Verlag* (1965), Mannheim

LINDGREN F.T., JENSEM L.C., HATCH F.T. (1972), The isolation and quantitative analysis of serum lipoproteins. In: NELSON, G.J. (ed), *Blood lipids and lipoproteins: Quantitation, composition and metabolism*. Wiley - Interscience, New York, pp 181 - 274

NELSON G.J. (1972), Handling extraction and storage of blood samples. In: NELSON, G.J. (ed.), *Blood lipids and lipoproteins: Quantitation, composition and metabolism*. Wiley - Interscience, New York, pp 3 - 24

RÖSCHLAU P., BERNT E., GRUBER W. (1974), Enzymatische Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum. *Klin Chem Klin Biochem* 12: 403 - 407

ROTHLIN M.E., (1964), Zusammensetzung der freien Fettsäuren im arteriellen Blut. *Schweiz Med Wochenschrift* 94: 255 - 257

SCHNAPER H., FITZ A., FROHLICH E., GOLDMAN A., PERRY jr. H.M., STEELE B (1977), Chlorthalidone and serum cholesterol. *Lancet* 2: 295

SCHOENFELD M.R., GOLDBERGER E. (1964), Hypercholesterolemia induced by thiazides: A pilot study. *Curr Ther Res* 6: 180 - 184

SENFET G., LOSERT W., SCHULTZ G., SITT R., BARTELHEIMER H.K. (1966), Ursachen der Störungen im Kohlenhydratstoffwechsel unter dem Einfluß sulfonamidierter Diuretika. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol Exp Pathol* 255: 369 - 382

SIGGURDSSON G., NICOLL A., LEWIS B. (1975), Conversion of very low density lipoprotein to low density lipoprotein. A metabolic study of apolipoprotein B kinetics in human subjects. *J Clin Invest* 56: 1481 - 1490

SIGURDSSON G., NICOLL A., LEWIS B. (1975), Is all low density lipoprotein-peptide derived from very low density lipoprotein peptide? *Med Res Soc* 48: 14p - 15p

STEINBERG D., M.D., PH.D. (1977), Lipoprotein Metabolism - New Insights from cell Biology. In: *Lipoproteins and Drugs*. Adv. experimental and biology 109: 3 - 25

TRINDER P.A. (1969), Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann clin Biochem* 6: 24

L e b e n s l a u f

Zur Person

Name: Despina Laaser geb. Kourniati

Geburtsdatum: 12.5.1952

Geburtsort: Chalkis in Griechenland

Eltern: Nikolaos Kourniati (Bauingenieur)
und Sophia Kourniati geb. Stefanidou
(Erzieherin)

Familienstand: Seit 1982 verheiratet mit Dr. Andreas
Laaser. Im gleichen Jahr Geburt der
Tochter Sonja.

Aus- und Weiterbildung

1958 - 1962 ' Besuch der Grundschule in Chalkis

1962 - 1964 Besuch der Grundschule in Athen

1964 - 1970 Besuch der Deutschen Schule in Athen
(Dörpfeld Gymnasium)

1970 Reifeprüfung an der Deutschen Schule

1971 - 1972 Pharmaziestudium an der Aristotelion
Universität Thessaloniki

SS 72 - SS 74 Wirtschaftswissenschaftsstudium an der
Freien Universität Berlin

WS 74 - SS 77 Pharmaziestudium an der Aristotelion
Universität Thessaloniki

November 1977 Pharmazeutische Abschlußprüfung
(Note: sehr gut)

1978 Beginn der Dissertation unter Leitung
von Herrn Prof. Dr. med. H. Kewitz am
Institut für Klinische Pharmakologie
der Freien Universität Berlin im
Klinikum Steglitz

März 1982 Approbation als Apothekerin

